

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO A PARTIR DE
HIDROLIZADOS DE RAQUIS DE PALMA AFRICANA (*Elaeis guineensis*), POR
FERMENTACIÓN CON LA BACTERIA *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

ANDREA MARCELA ROSERO BERNAL

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO

2017

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO A PARTIR DE
HIDROLIZADOS DE RAQUIS DE PALMA AFRICANA (*Elaeis guineensis*), POR
FERMENTACIÓN CON LA BACTERIA *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

ANDREA MARCELA ROSERO BERNAL

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

Director

JESÚS ADRIANO ROMO RAMOS
M.Sc en Bioquímica

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO

2017

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas al trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1º del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Jesús Adriano Romo Ramos
Asesor de tesis

Olga Lucía Benavides Calvache
Jurado

Jesús Antonio Cabrera Moncayo
Jurado

San Juan de Pasto, 2 de marzo de 2017

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han hecho parte de mi proceso de formación personal y académica a las que me gustaría agradecerles por su colaboración, amistad, consejos, apoyo y compañía; algunas de ellas presentes aquí conmigo y otras solo en mis recuerdos...

A mis padres y hermana infinitas gracias por estar siempre presentes, por creer en mí y haberme brindado todo su apoyo de manera incondicional a lo largo de mi vida.

Al profesor Jesús Romo por su apoyo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia y motivación logró que el presente proyecto terminara exitosamente.

A la bacterióloga Nancy Galindez por su colaboración en el desarrollo de la parte experimental de esta investigación y por permitirme trabajar en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología.

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño (VIPRI) por brindar el apoyo financiero con el cual se pudo adquirir diferentes reactivos y materiales para desarrollar esta investigación.

Al personal de Laboratorios Especializados que de una u otra manera colaboraron con el desarrollo de la parte experimental del proyecto.

A los jurados por el tiempo dedicado en la revisión del presente trabajo, sus aportes, recomendaciones y comentarios que permitieron enriquecerlo.

A los docentes del Departamento de Química por haber aportado un granito de arena en mi formación profesional.

A mis amigas Jessi, Cathe, Ingrid, Vivis y especialmente a mi querida amiga Fer por su amistad sincera y su apoyo incondicional, por ser una de mis cómplices de aventuras a lo largo de este arduo camino y con quien pude compartir muchos momentos de alegría y también de locuras.

A todos, mil gracias

DEDICATORIA

A mis padres, Aura Nelly y José Libardo por su amor, trabajo y sacrificios, su apoyo incondicional, su comprensión, sus valiosos consejos, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mi hermana Saira Nicol por su profundo cariño, por contagiarme de sus risas y por hacerme ver la vida a través de los ojos de un niño, sin complicaciones y llena de alegría.

A mi familia por su apoyo moral y espiritual y que de una u otra forma estuvieron a mi lado apoyándome para alcanzar este logro.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	19
1. OBJETIVOS	21
1.1 OBJETIVO GENERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2. ESTADO DEL ARTE	22
2.1 ANTECEDENTES	22
2.2 MARCO TEÓRICO	23
2.2.1 Los aminoácidos en la industria	23
2.2.2 Ácido glutámico	25
2.2.2.1 Producción biotecnológica de ácido glutámico	26
2.2.2.2 Parámetros para la producción biotecnológica de ácido Glutámico	27
2.2.3 Características de las <i>Corynebacterias</i> : <i>Corynebacterium glutamicum</i>	28
2.2.3.1 Metabolismo de <i>Corynebacterium glutamicum</i> para la producción de ácido glutámico	29
2.2.4 Métodos de identificación y purificación de aminoácidos	32
2.2.5 Sustrato: Raquis de palma africana	34
2.2.5.1 Clasificación taxonómica	35
2.2.5.2 Composición y productos de los racimos de palma africana	36
2.2.5.3 Composición química del raquis de la palma	36
3. METODOLOGÍA	38
3.1 MUESTREO	38
3.2 HIDRÓLISIS ÁCIDA	39
3.3 MICROORGANISMO	41
3.3.1 Activación	41
3.3.2 Almacenamiento	41
3.3.3 Conservación del microorganismo	42
3.4 PROCESO DE FERMENTACIÓN	42
3.4.1 Determinación del perfil cinético de la cepa <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	42
3.4.2 Biorreactor	43
3.4.3 Proceso de fermentación	44
3.4.4 Recuperación y purificación de ácido glutámico	46

3.5	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN	47
3.5.1	Análisis mediante cromatografía de gases (GC-FID)	47
3.5.2	Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-PDA)	48
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	49
4.2	RESULTADO DE LA HIDRÓLISIS	50
4.3	CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	52
4.4	PROCESO FERMENTATIVO	54
4.4.1	Cinética de crecimiento bacteriano de <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	54
4.4.2	Producción de ácido glutámico	55
4.5	RECUPERACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO L-GLUTÁMICO	59
4.6	IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	61
4.6.1	Análisis por GC-FID	61
4.6.2	Análisis por HPLC-PDA	63
	CONCLUSIONES	65
	RECOMENDACIONES	66
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	ANEXOS	75

LISTA DE TABLAS

		Pág
Tabla 1	Principales usos de algunos aminoácidos	24
Tabla 2	Estructura y propiedades fisicoquímicas del ácido glutámico	26
Tabla 3	Clasificación taxonómica de la palma africana	35
Tabla 4	Composición y productos de los racimos de palma africana	36
Tabla 5	Composición media de racimos de palma africana	37
Tabla 6	Características generales de <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	41
Tabla 7	Fuente de carbono, nitrógeno y micronutrientes utilizados en el proceso de fermentación para la producción de ácido glutámico	44
Tabla 8	Composición de los medios A y B	45
Tabla 9	Condiciones de inyección de la muestra al sistema GC-FID	47
Tabla 10	Condiciones de análisis de la muestra mediante HPLC-PDA	48
Tabla 11	Concentraciones de azúcares totales promedio resultado de la hidrólisis ácida de raquis de palma africana	50
Tabla 12	Tiempo de fermentación, consumo fuente de carbono y producción de ácido L-glutámico en los diferentes tratamientos	56
Tabla 13	Porcentaje de recuperación de ácido glutámico a partir de los diferentes tratamientos	61
Tabla 14	Tiempo de retención del ácido glutámico obtenido en cada tratamiento	63

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 Raquis de palma africana	35
Figura 2 Ubicación de la región del departamento de Nariño donde se realizó el muestreo	38
Figura 3 Raquis de palma africana recolectado	39
Figura 4 Montaje utilizado en el proceso de hidrólisis ácida (sistema de reflujo operado a condiciones atmosféricas)	40
Figura 5 Diseño del biorreactor utilizado en el proceso fermentativo	43
Figura 6 Montaje utilizado en el proceso de fermentación para la producción de ácido glutámico	46
Figura 7 Fibras de raquis obtenidas del proceso de secado y molido	49
Figura 8 Crecimiento de <i>Corynebacterium glutamicum</i> en agar nutritivo	53
Figura 9 Características microscópicas de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	53
Figura 10 Perfil de la cinética de crecimiento bacteriano de <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 en caldo nutritivo	54
Figura 11 Gráfico de interacciones cantidad fuente de carbono y nitrógeno	58
Figura 12 Cinética de fermentación para el tratamiento T2	58
Figura 13 Ácido L-glutámico	59
Figura 14 Corrida cromatográfica	60
Figura 15 Cromatograma de ácido L-glutámico estándar	62
Figura 16 Cromatograma de ácido L-glutámico obtenido en el tratamiento T2	62
Figura 17 Cromatograma obtenido mediante HPLC-PDA del ácido L-glutámico producto del tratamiento T2	63
Figura 18 Comparación ácido L-glutámico patrón con el obtenido en el tratamiento T2	64

LISTA DE ESQUEMAS

		Pág
Esquema 1	Biosíntesis de ácido glutámico utilizando glucosa como fuente de carbono	31
Esquema 2	Reacción de aminoácidos con ninhidrina	32

GLOSARIO

AMINACIÓN REDUCTIVA: Reacción de un compuesto carbonílico (cetona o aldehído) con una amina primaria o secundaria en medio moderadamente ácido y en presencia de un reductor. El mecanismo del proceso implica en primer lugar la condensación de la amina con el compuesto carbonílico para dar lugar a una imina (o una sal de imino) que posteriormente es reducida¹.

AUXÓTROFO: Organismo que ha mutado o ha perdido la habilidad de sintetizar sustancias requeridas para su crecimiento y metabolismo. El organismo mutante requiere sustancias específicas como suplemento nutritivo para crecer².

BIOCONVERSIÓN: Proceso por el cual se produce la transformación de un compuesto químico en otro mediante el uso de un sistema biológico, que puede ser un organismo completo, una enzima o un sistema enzimático³.

BIOMASA: Grupo de productos energéticos y materia prima de tipo renovable que se origina a partir de materia orgánica formada por vía biológica, quedando fuera de este concepto los combustibles fósiles y las materias orgánicas derivadas de éstos como los plásticos y la mayoría de los productos sintéticos⁴.

BIORREACTOR: Sistema en el que se lleva a cabo una conversión biológica. Esta definición puede aplicarse a cualquier conversión realizada por enzimas, microorganismos, células animales o vegetales⁵.

CUESCO: Cáscara que recubre la almendra y a las fibras resultantes del proceso de prensado del fruto de la palma africana⁶.

¹ CAMPS, Pelayo; VÁQUEZ, Santiago y ESCOLANO, Carmen. Fundamentos de Síntesis de Fármacos. Barcelona, Publicacions i Edicions Universitat de Barcelona, 2005 p. 20

² THE NATIONAL AGRICULTURAL LIBRARY'S. Glossary [en línea] <<http://agclass.nal.usda.gov/mtwdk.exe?w=14077&k=default&s=5&t=2&n=1&l=115>> [citado en 28 de junio de 2016]

³ VELASCO, Rodrigo; MONTENEGRO, Diego; VÉLEZ, John; GARCÍA, Carlos y DURANGO, Diego. Biotransformation of compounds aromatic substituted by filamentous phytopathogenic fungus of the genera *Botryodiplodia* and *Colletotrichum*. En: Rev. Soc. Quím. Vol. 75 (2009) p. 94-111

⁴ RENOVETEC. ¿Qué es la biomasa? [en línea] <<http://www.plantasdebiomasa.net/que-es-la-biomasa.html>> [citado en 09 de noviembre de 2016]

⁵ BIOPHARMA. Disposable Bioreactors: The Next Generation [en línea] <<http://www.biopharminternational.com/disposable-bioreactors-next-generation>> [citado en 28 de junio de 2016]

⁶ FORERO, Carlos; CEDIEL, Alexandra; RIVERA, José; SUAZA, Andrea y SIERRA, Fabio. Preliminary study on the energetic potential of palm cuesco and coconut shell in Colombia. En: RISE. Vol. 8 (2012) p. 19-25

DERIVATIZACIÓN: Transformación de un compuesto químico en otro de estructura similar pero con propiedades químicas diferentes. Esta técnica se emplea para mejorar la estabilidad térmica de compuestos polares y minimizar las interacciones no deseadas con el revestimiento de la columna y la inyección resultando en una mala forma de pico o la pérdida de masa a través de la adsorción⁷.

ENZIMA AUTOLÍTICA: Enzima que se encuentra presente en la célula viva y después de su muerte conduce a la lisis de sus propios componentes⁸.

PLEOMÓRFICO: Que se presenta en diversas formas diferenciadas. En cuanto a las células, que varía en el tamaño y la forma de las células o sus núcleos⁹.

RAQUIS: Racimo vacío o tusa que se distribuye uniformemente alrededor de la palma generado en la etapa de desfrutamiento y considerado como residuo sólido¹⁰.

REACCIONES ANAPLERÓTICAS: Rutas que convergen en el ciclo de Krebs y permiten reponer los intermediarios del ciclo para que este siga funcionando¹¹.

TRANSAMINACIÓN: Transferencia de un grupo amino de un determinado aminoácido a un α -oxoácido, con el resultado de un nuevo aminoácido y de la formación del α -oxoácido correspondiente¹².

⁷ WOO, Kang-Lyung. Determination of amino acids in foods by reversed-phase HPLC with new precolumn derivatives, butylthiocarbamyl, and benzylthiocarbamyl derivatives compared to the phenylthiocarbamyl derivative and ion exchange chromatography. En: Mol Biotechnol. Vol. 24 (2003) p. 69-88

⁸ SAIZ, Alejandro; BONETE, Enrique; CARRILLO, Marc; FERRAJOLI, Luigi *et al.* Responsa Iurisperitorum Digesta. Salamanca. Editores Universidad de Salamanca, 2000. p. 264

⁹ INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Diccionario de cáncer. [en línea] <<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=44342>> [citado en 10 de noviembre de 2016]

¹⁰ SANTOS, Gloria. Diagnóstico y propuesta de gestión de los residuos sólidos generados por el proceso de extracción de aceite crudo de palma africana en palmas oleaginosas bucarelia S.A. Bucaramanga, 2007. Tesis (Especialización en Química Ambiental). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química

¹¹ FEDUCHI, Elena; BLASCO, Isabel; ROMERO, Carlos y YAÑEZ, Esther. Bioquímica. Conceptos esenciales. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana, 2011. p. 243

¹² MENÉNDEZ, José. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA. Bases fisiopatológicas. Madrid. Ediciones Norma, 1999. p. 139

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín trifosfato
E	Ácido glutámico
α	Alfa
°C	Grados Celsius
CCD	Cromatografía en capa delgada
cel	Células
γ	Gama
G	Gramos
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
Glu	Ácido glutámico
GMS	Glutamato monosódico
GS	Glutamina sintetasa
5-HMF	5-Hidroximetilfurfural
HPLC-PDA	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de fotodiodos
km	Kilómetros
L	Litros
LA	Ácido levulínico
λ	Longitud de onda
μm	Micrómetros
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mol	Moles
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
MTBSTFA	N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida
N	Normal
NADP	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
NADPH ₂	Nicotínamida adenín dinucleótido fosfato dihidrogenado
nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
PITC	Fenilisotiocianato
R _f	Factor de retención
rpm	Revoluciones por minuto
SRUT	Sociedad para la Investigación en el Gusto
TBDMS	Terc-butildimetilsililo
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Tn	Toneladas
t _R	Tiempo de retención

Vol

Volumen

LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo A Método de Miller y recta de calibrado para cuantificación de azúcares	75
Anexo B Especificaciones caldo nutritivo Oxoid CM 0001	76
Anexo C Especificaciones agar nutritivo Oxoid CM 0003	77
Anexo D Cuantificación de ácido L-glutámico por el método de ninhidrina	78
Anexo E Resultados de hidrólisis ácida de raquis de palma africana: replicas, absorbancia y concentración de azúcares	79
Anexo F Análisis de varianza para el proceso de hidrólisis de raquis de palma africana	80
Anexo G Prueba de múltiples rangos para la concentración de azúcares por tiempo	80
Anexo H Análisis de Varianza para la producción de ácido glutámico	81
Anexo I Prueba de múltiples rangos para la producción de ácido glutámico por cantidad de fuente de carbono	81
Anexo J Prueba de múltiples rangos para la producción de ácido glutámico por cantidad de fuente de nitrógeno	82
Anexo K Cinética de fermentación para el tratamiento T1	82
Anexo L Cinética de fermentación para el tratamiento T3	83
Anexo M Cinética de fermentación para el tratamiento T4	83
Anexo N Cromatograma de ácido L-glutámico obtenido mediante el tratamiento T1	84
Anexo O Cromatograma de ácido L-glutámico obtenido mediante el tratamiento T3	84
Anexo P Cromatograma de ácido L-glutámico obtenido mediante el tratamiento T4	85
Anexo Q Cromatograma HPLC-PDA de ácido L-glutámico estándar	85

RESUMEN

En el presente estudio se obtuvo ácido L-glutámico a partir de hidrolizados de raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) mediante fermentación discontinua (batch) utilizando como organismo fermentador una cepa de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Los azúcares reductores usados como sustrato se obtuvieron mediante hidrólisis ácida, encontrando que las mejores condiciones se lograron con un tiempo de digestión de 6 horas y una concentración de ácido sulfúrico del 2%.

El proceso fermentativo se llevó a cabo usando los azúcares obtenidos a una concentración de 1 g/L, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno a 7 g/L y diferentes concentraciones de micronutrientes como $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4 , K_2HPO_4 , tiamina y biotina; a partir de lo cual en un tiempo de 96 horas de fermentación se obtuvo un rendimiento del 56,67%. Su pureza se confirmó mediante cromatografía en capa delgada y se identificó por cromatografía de gases (GC-FID) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-PDA) cuyos tiempos de retención fueron similares a los presentados por el ácido L-glutámico de alta pureza utilizado como patrón.

ABSTRACT

This study reports on the synthesis of the L-glutamic acid. It was obtained by hydrolysis of the rachis African palm (*Elaeis guineensis*). First, for discontinuous fermentation (batch) was used a fermentator organism, *Corynebacterium glytamicum* ATCC 13032 strain. The reducing sugars used as substrate were got by hydrolysis acid, the best conditions were found when the time of digestion was 6 hours and the concentration of the sulfuric acid was 2%. The fermentation process was carried out in 96 hours, the sugars obtained with a concentration of 1 g/L were used, ammonium sulfate 7 g/L as source of nitrogen and different micronutrients as: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4 , K_2HPO_4 , thiamin and biotin, its yield was 56,67%.

Its purity was confirmed by Thin Layer Chromatography (TLC) and moreover, the glutamic acid was identified by Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID) and High-Performance Liquid Chromatography with Photo-Diode Array (HPLC-PDA) in which the times of retention were similar to L-glutamic used as the standard.

INTRODUCCIÓN

El departamento de Nariño es una región agrícola por excelencia, siendo este sector su principal fuente económica. Entre las diversas actividades agrícolas que se llevan a cabo se encuentra el cultivo de palma africana o palma de aceite, el cual genera un promedio anual de 859.554 toneladas a nivel nacional¹³, y que de acuerdo a reportes de Fedepalma, el departamento tiene el potencial de volver a contar con más de 30.000 hectáreas que fueron arrasadas por la pudrición del cogollo (PC), llegar a tener alrededor de 50.000 hectáreas y producir cerca de 200.000 toneladas de aceite de palma crudo¹⁴.

La zona de cultivo se ubica en la Costa Pacífica del departamento, en el Municipio de Tumaco y actualmente los indicadores de crecimiento de la palmicultura muestran que la producción de palma ha aumentado y se estima que para el 2020 se podría triplicar¹⁵. Este cultivo es de gran rentabilidad por su capacidad productora de aceite cumpliendo un rol importante dentro de la economía regional y nacional. No obstante, terminado el proceso de extracción de aceite son generadas grandes cantidades de subproductos y residuos como las fibras, el cuesco de las nueces y el raquis cuyo valor estimado varía entre 75 a 100 Tn por hectárea¹⁶; estos no son suficientemente aprovechados y son causales de contaminación ambiental debido a la carencia de alternativas que conlleven a su aprovechamiento en procesos industriales¹⁷.

La composición de estos residuos principalmente el raquis resulta ser bastante heterogénea, el cual presenta un alto contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y otros componentes adicionales denominados extractivos¹⁸, que podrían ser utilizados como materia prima en la bioconversión de productos de valor agregado y de elevado potencial económico por medio de rutas biotecnológicas, pues se ha demostrado que es factible convertir la biomasa residual en diferentes productos

¹³ UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Caracterización del departamento de Nariño -ODDR- [en línea] <http://www.observatorioddrr.unal.edu.co/productos_academicos/nuevos/narino/Caracterizacion_del_departamento_de_Narino.pdf> [citado en 14 de febrero de 2014]

¹⁴ FEDEPALMA. Tumaco requiere medidas extraordinarias para alcanzar soluciones a su problemática. [en línea] <<http://web.fedepalma.org/node/984>> [citado en 14 de febrero de 2017]

¹⁵ PIARPUZÁN, Diego; QUINTERO, Julián y CARDONA, Carlos. Empty fruit bunches from oil palm as a potential raw material for fuel ethanol production. En: Biomass Bioenerg. Vol. 35 (2011) p. 1130-1137

¹⁶ SANTOS, Op. cit., p. 44

¹⁷ REYES, Sandra y ORTIZ, Julio. Aprovechamiento de los residuos de la palma africana [en línea] <<http://www.materiales-sam.org.ar/sitio/biblioteca/CONAMET-SAM2008/pdfs/a9.pdf>> [citado en 17 de febrero de 2014]

¹⁸ BAYONA, Olga y SÁNCHEZ Melba. Activación física del raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) para la obtención de carbón activado. Bucaramanga, 2006. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química

como biocombustibles, alimento animal, productos químicos, entre otros¹⁹.

Actualmente, una parte de la biomasa es implementada por los agricultores como fuente de nutrientes para el suelo, sin embargo esto trae consigo ciertas desventajas como la contaminación debido al proceso de descomposición y el impedimento del libre drenaje del agua a las raíces de las plantas²⁰. Por otra parte, si los residuos sobrepasan la cantidad que se puede reutilizar como “abono”, simplemente son sometidos a un proceso de incineración generando contaminación atmosférica a causa del humo producido²¹.

Teniendo en cuenta el alto contenido de celulosa y hemicelulosa presente en el raquis o tusa, en el presente proyecto de investigación se aprovecharon estas propiedades y se desarrolló una metodología para obtener los azúcares reductores mediante hidrólisis ácida, los cuales fueron usados como sustrato en fermentaciones bacterianas para su bioconversión en ácido L-glutámico, utilizando como microorganismo fermentador *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

El ácido glutámico es el aminoácido de mayor consumo a nivel mundial. Se producen aproximadamente 370.000 toneladas anuales con un precio de 1.3 dólares por kilogramo para su comercialización. La sal sódica del aminoácido, el glutamato monosódico (GMS) es muy utilizado en la industria alimentaria por sus propiedades acentuadoras del sabor²²; también, se lo utiliza ampliamente en la industria química como precursor en la síntesis de proteínas y diversos compuestos²³ y en la industria farmacéutica gracias a que posee acción sobre el tejido cerebral debido a que es un neurotransmisor estimulante, además de que estudios recientes revelan que este aminoácido actúa como un agente anticanceroso²⁴.

¹⁹ GONZÁLEZ, Yolanda; GONZÁLEZ, Orfil y NUNGARAY, Jesús. Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. En: Redalyc. Vol 3 (2005) p. 1-18

²⁰ RIOS, Sandra y VESGA, Stella. Obtención y evaluación de pulpa a partir del raquis de la palma africana mediante procesos de soda y soda-antraquinona. Bucaramanga, 2008. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química

²¹ BASIRON, Yusof y DARUS, Ariffin. La industria de la palma de aceite de contaminación a cero desechos. En: Revista Palmas. Vol. 18 (1997) p. 51-56

²² GARCÍA, Mariano; QUINTERO, Rodolfo y LÓPEZ, Agustín. Biotecnología alimentaria. Producción industrial de aminoácidos. México. LIMUSA, 2004. p. 403-419

²³ MUÑOZ, Javier y PÉREZ, William. Obtención de ácido glutámico a partir de hidrolizados de papa por procesos de fermentación, utilizando la bacteria *Corynebacterium glutamicum*. San Juan de Pasto, 2004. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias exactas y Naturales. Departamento de Química

²⁴ SATYAJIT, Dutta; SUPRATIM, Ray y NAGARAJAN, Kuppuswamy. Glutamic acid as anticancer agent: An overview. En: Saudi Pharm J. Vol. 21 (2013) p. 337-343

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener, purificar y cuantificar ácido glutámico a partir de hidrolizados de raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) mediante procesos de fermentación bacteriana utilizando *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones óptimas en la obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis ácida del raquis de palma africana.
- Establecer las mejores condiciones de fermentación para la obtención de ácido glutámico mediante la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, utilizando hidrolizados de raquis de palma africana.
- Recuperar y purificar el ácido glutámico de los productos de fermentación mediante técnicas fisicoquímicas.
- Caracterizar el ácido glutámico obtenido mediante técnicas espectrofotométricas y cromatográficas.
- Cuantificar la producción del aminoácido obtenido y determinar el rendimiento del proceso.

2 ESTADO DEL ARTE

2.1 ANTECEDENTES

Los residuos lignocelulósicos son muy importantes debido a su enorme disponibilidad y a las diferentes fuentes agroindustriales que los generan; la bioconversión de estos residuos en productos químicos y biocombustibles actualmente es de gran interés, ya que son de bajo costo, renovables y se encuentran ampliamente extendidos en la naturaleza²⁵.

En 2006, Rahman *et al.*²⁶ realizaron estudios enfocados en la producción de xilosa a partir de cáscaras del fruto de palma de aceite mediante hidrólisis con ácido sulfúrico diluido; las cáscaras son una fuente potencial de xilosa, la cual puede ser utilizada como materia prima para la producción de xilitol, un producto de alto valor comercial.

En el mismo año, este autor llevó a cabo también estudios de optimización de la hidrólisis ácida de racimos de palma de aceite para la producción de xilosa²⁷.

En 2008, Quintana *et al.*²⁸ llevaron a cabo estudios sobre la producción de pulpa papelera a partir de raquis residual, para lo cual caracterizaron las fibras fisicoquímicamente y las sometieron a un proceso de steam explosion como pretratamiento para liberar las hemicelulosas, concluyendo que las pulpas obtenidas tienen propiedades cercanas a las propiedades de pulpa Kraft de madera.

En 2009, Zhang *et al.*²⁹ enfocaron su estudio en la optimización de la hidrólisis catalizada con ácido diluido de racimos de palma para la producción de un alto rendimiento de xilosa.

En 2011, Piarpuzan *et al.*³⁰ realizaron estudios con racimos de palma de aceite

²⁵ ALVAREZ, Antonio; GARCÍA, Enrique; DOMÍNGUEZ, María; GRANADOS, Joaquín *et al.* Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. En: Rev. Iberoam. Polim. Vol. 13 (2012) p. 140-150

²⁶ RAHMAN, Sha; CHOUDHURY, Jean y AHMED, Ali. Production of xylose from oil palm empty fruit bunch fiber using sulfuric acid. En: Biochem. Eng. J. Vol. 30 (2006) p. 97-103

²⁷ RAHMAN, Sha; CHOUDHURY, Jean; AHMED, Ali y KAMARUDDIN, Ahsler. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. En: Bioresour. Technol. Vol. 98 (2007) p. 554-559

²⁸ QUINTANA, Germán; ARROYAVE, Mónica y SUAREZ, David. Obtención de pulpa a partir de los residuos de palma africana pretratados con steam explosion. En: CONGRESO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACION EN CELULOSA Y PAPEL (V : 2008 : Guadalajara, México)

²⁹ ZHANG, Dongxu; LING ONG, Yee; LI, Zhi y CHUAN WU, Jin. Optimization of dilute acid-catalyzed hydrolysis of oil palm empty fruit bunch for high yield production of xylose. En: Chem. Eng. J. Vol. 181-182 (2012) p. 636-642

³⁰ PIARPUZÁN, Op. cit., p. 1130

como materia prima potencial para la producción de etanol, en donde realizaron un pretratamiento alcalino al sustrato y posteriormente lo sometieron a hidrólisis para la liberación de azúcares, a partir de los cuales se obtuvo etanol por medio de fermentación usando cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

A nivel regional en 2013, Gómez y Lagos obtuvieron ácido glutámico a partir de hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique mediante un proceso de fermentación discontinuo utilizando la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 obteniéndose rendimientos del 56,01% y 36,88% respectivamente³¹. De igual manera Muñoz y Pérez obtuvieron el aminoácido partiendo de hidrolizados de residuos de papa usando el mismo microorganismo fermentador³².

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Los aminoácidos en la industria

Las actividades de investigación y desarrollo relacionadas con la producción de aminoácidos han tenido una alta y sostenida tasa, debido principalmente a que en los años 80 se inició la aplicación de las nuevas técnicas de biología molecular y biotecnología en este campo³³.

Los aminoácidos tienen una amplia gama de aplicaciones industriales (tabla 1). Tradicionalmente han sido usados en la industria de los alimentos como potenciadores del sabor y en la alimentación animal y humana como aditivos. Además, en años recientes se ha incrementado el uso de aminoácidos a nivel farmacéutico en sueros y soluciones intravenosas.

³¹ GÓMEZ, Yanet y LAGOS, Verónica. Obtención y purificación de ácido glutámico a partir de hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique fermentables por la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. San Juan de Pasto, 2013. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química

³² MUÑOZ, Op. cit., p. 18

³³ GARCÍA, Op. cit., p. 419

Tabla 1: Principales usos de algunos aminoácidos

Aminoácidos	Aplicación
Glicina	Edulcorante, nutrición humana, agente terapéutico (distrofia muscular) y en cosméticos.
Alanina, prolina, serina	Edulcorante, nutrición humana y cosméticos.
Valina, leucina, isoleucina y fenilalanina	Saborizante amargo y nutrición humana.
Metionina	Nutrición humana y animal, uso terapéuticos en hepatitis, intoxicaciones y como agente lipitrópico
Triptófano	Nutrición humana y animal, saborizante amargo.
Arginina	Saborizante amargo, nutrición, agente terapéutico en hiperamonemia y en desórdenes hepáticos.
Histidina	Nutrición humana, agente en úlceras duodenales y gástricas, indispensable en la regeneración de hemoglobina.
Lisina	Nutrición humana y animal.
Ácido aspártico y glutámico	Nutrición humana, agente terapéutico, saborizante ácido, cosméticos.
Aspartato y glutamato de sodio	Acentuadores del sabor.
Cistina y cisteína	Nutrición humana, agente terapéutico, cosméticos.
Ácido aspártico y fenilalanina	Edulcorante (aspartamo).

Fuente: GARCÍA. Biotecnología alimentaria. Producción industrial de aminoácidos. 2004

Aproximadamente 60% de los aminoácidos producidos se destinan a la industria de los alimentos, en la cual se usan individualmente o en combinación para acentuar el sabor. Por ejemplo, el aspartato de sodio y la DL-alanina son añadidos a jugos de frutas para mejorar el sabor, la glicina se agrega a alimentos que contienen edulcorantes, la L-cisteína mejora la calidad del pan durante el proceso de su preparación y actúa como antioxidante en jugos de frutas, el L-triptófano combinado con la L-histidina actúan como antioxidante y se usan en la leche en polvo para evitar rancidez y el colorante aspartamo de bajas calorías usado en refrescos se obtiene a partir de L-fenilalanina y ácido L-aspártico³⁴.

A pesar de que en la mayoría de los casos una gran cantidad de aminoácidos se usan como acentuadores del sabor, en la actualidad no se conoce exactamente de qué manera actúan estos potenciadores. La Sociedad para la Investigación en el Gusto (SRUT) de Japón, definió este gusto como “umami”: sabor que se detecta en receptores independientes a los cuatro sabores básicos (dulce, ácido, amargo y

³⁴ Ibid., p. 403

salado)³⁵.

Por otra parte, la demanda de aminoácidos en la industria química está creciendo; a medida que sus precios bajan su uso es más diversificado, por ejemplo en la manufactura de polímeros sirven como materia prima, tal es el caso de las fibras de polialanina o bien las resinas de isocianato de lisina o el poli-gama-metilglutamato que es usado como capa superficial de la piel sintética, también la glicina que es materia prima inicial para la producción del herbicida glifosato y la treonina para el aztreonam (antibiótico). En medicina, soluciones de aminoácidos esenciales se usan como sueros intravenosos para tratamientos postoperatorios³⁶.

2.2.2 Ácido glutámico

El ácido glutámico (Glu, E), es un aminoácido estructural de las proteínas, que se encuentra en todos los seres vivos. Interviene en múltiples reacciones enzimáticas de transaminación, útiles para formar otros aminoácidos. Este se presenta siempre en los seres vivos bajo su forma L-, la forma D- del aminoácido no se encuentra en los seres vivos ni tiene propiedades como acentuador de sabor, por el contrario, posee un sabor ácido muy desagradable³⁷. Las setas, el tomate y el atún son ejemplos naturales de organismos que contienen una gran cantidad de ácido glutámico libre. En algunos quesos también se puede encontrar cantidades elevadas y es producido mediante la hidrólisis enzimática de la caseína gracias a proteasas y peptidasas pertenecientes a bacterias del ácido láctico³⁸.

El sabor del glutamato monosódico (GMS), la sal sódica del aminoácido, se usa principalmente como aditivo alimentario siendo uno de los sabores fundamentales característico de la comida oriental. No es tóxico y su exceso es destinado metabólicamente a la producción de energía³⁹.

La estructura y algunas propiedades del ácido glutámico se presentan en la siguiente tabla:

³⁵ HERNÁNDEZ, Alicia; ALFARO, Ileana, y ARRIETA, Ronald. Microbiología Industrial. San José, Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia, 2003. p. 206

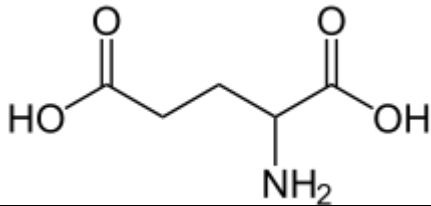
³⁶ GARCÍA, Op. cit., p. 403

³⁷ KURIHARA, Kenzo. Glutamate: from discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami). En: Am. J. Clin. Nutr. Vol. 90 (2009) p. 19-22

³⁸ MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CIENCIA. La Transformación Industrial de la Producción Agropecuaria. [en línea] <<https://sede.educacion.gob.es/publiventa/PdfServlet?pdf=VP11730.pdf&ar ea=E>> [citado en 20 de marzo de 2014]

³⁹ Ibid., p. 106 - 110

Tabla 2: Estructura y propiedades fisicoquímicas del ácido glutámico

Fórmula molecular	C ₅ H ₉ NO ₄
Peso molecular	147.13 g/mol
Estructura	
Solubilidad en agua	11.1 g/L a 25°C
Punto isoeléctrico	3.08
Constantes de disociación	pK ₁ = 2.1, pK ₂ = 4.07, pK ₃ = 9,47

Fuente: GÓMEZ. Obtención y purificación de ácido glutámico a partir de hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique fermentables por la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. 2013

2.2.2.1 Producción biotecnológica de ácido glutámico

La producción biotecnológica de aminoácidos tradicionalmente se ha basado en la conversión de diferentes fuentes de carbono tales como glucosa, melazas, hidrolizados de almidón, n-alcanos y otros, obteniéndose altos rendimientos. Prácticamente, existen para todos los aminoácidos procesos de fermentación desarrollados, pero no en todos los casos se producen por esta vía. Además, continuamente surgen procesos tanto biológicos como químicos que compiten entre sí, como el método más económico para la obtención de un aminoácido específico⁴⁰.

El ácido glutámico se obtiene predominantemente por procedimientos microbianos, aunque es también producido químicamente. Los investigadores japoneses iniciaron el desarrollo del proceso de fermentación directa debido a que el ácido glutámico que se formaba por síntesis química resultaba ser la mezcla racémica D,L. A partir de estudios sobre 2.000 microorganismos en diferentes medios, se encontró que el L-glutámico se producía por una amplia variedad de bacterias, levaduras y hongos⁴¹.

A nivel industrial, éste aminoácido se obtiene por fermentación de azúcares residuales de la industria agroalimentaria. Se conocen numerosos organismos capaces de producirlo a partir de diferentes fuentes de carbono, entre los más

⁴⁰ GARCÍA, Op. cit., p. 409

⁴¹ CRUEGER, Wulf y CRUEGER, Anneliese. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Zaragoza, España. Acribia S. A., 1993. p. 179

importantes se encuentran:

✓ <i>Corynebacterium glutamicum</i>	→	Melazas
✓ <i>Brevibacterium</i>	→	Acetato
✓ <i>Brevibacterium divaricatum</i>	→	Glucosa + acetato de amonio
✓ <i>Arthrobacter paraffineus</i>	→	n-alcanos ⁴²

2.2.2.2 Parámetros para la producción biotecnológica de ácido glutámico

En condiciones óptimas de cultivo las bacterias que producen ácido glutámico convierten aproximadamente el 50-60% de la fuente de carbono añadida a ácido glutámico. Si se utilizan condiciones de fermentación menos favorables, de forma que se obtenga una baja producción de ácido glutámico, se ha observado un aumento en la masa celular y secreción de lactato, succinato, α -cetoglutarato, glutamina y N-acetilglutamina. Así, los parámetros más importantes durante el proceso de fermentación son:

- **Fuentes de carbono.** Pueden ser utilizados en el proceso de fermentación una amplia variedad de carbohidratos. El más utilizado es la glucosa, mientras que la fructosa, maltosa, ribosa, y xilosa también son utilizados pero en menor grado. De las fuentes de carbohidrato no refinadas, las melazas de cañas de azúcar y remolacha son las más importantes, pero también se emplean frecuentemente los hidrolizados de almidón⁴³.
- **Fuentes de nitrógeno.** Es esencial en el proceso de fermentación el suministro abundante de una fuente adecuada de nitrógeno tal como las sales amoniacaes, puesto que el NH_3 se incorpora a la molécula del aminoácido; no obstante, la concentración de iones amonio debe mantenerse estable en el medio puesto que las concentraciones demasiado altas son perjudiciales para el crecimiento celular y la formación del producto⁴⁴. Además de las sales amoniacaes, puede usarse como fuente de nitrógeno amonio (gaseoso o en solución acuosa). En la producción industrial la adición de amonio permite el control del pH y elimina el problema de la toxicidad del mismo. La mayor parte de las bacterias productoras de ácido glutámico poseen actividad ureasa, de forma que la urea también es frecuentemente utilizada como fuente de nitrógeno⁴⁵.

⁴² GARCÍA, Op. cit., p. 409

⁴³ OWEN, Ward. Biotecnología de la Fermentación: Principios, Procesos y Productos. Zaragoza, España. Acribia S. A., 1991. p. 183-198

⁴⁴ Ibid., p. 185

⁴⁵ CRUEGER, Op. cit., p. 183 - 184

- **Suministro de oxígeno.** La concentración de oxígeno debe ser balanceada, ya que cuando hay deficiencia de este se produce secreción de lactato y succinato, mientras que el exceso de oxígeno en presencia de una baja concentración de amonio conduce a la inhibición de crecimiento y producción de α -cetoglutarato. En ambos casos los rendimientos de ácido glutámico son mínimos⁴⁶.
- **Temperatura.** La temperatura afecta de manera notable en el crecimiento microbiano, debido a que los microorganismos tienen un rango restringido de temperatura para su crecimiento. Las fermentaciones generalmente son llevadas a cabo en el rango mesófilo (15-35°C) y debe escogerse la temperatura adecuada para conseguir el máximo crecimiento y la formación óptima del producto⁴⁷.
- **pH.** El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo microbiano, por lo tanto es importante tener un control sobre esta variable durante el desarrollo del proceso de fermentación, puesto que los microorganismos poseen un pH óptimo en el cual tienen mayor velocidad de crecimiento y rendimiento⁴⁸. En el caso de *Corynebacterium glutamicum*, se ha encontrado que a valores de pH entre 6 y 9 el microorganismo alcanza un estado homeostático y logra mantener un pH interno óptimo de $7,5 \pm 0,5$ ⁴⁹.

2.2.3 Características de las *Corynebacterias*: *Corynebacterium glutamicum*

Las *corynebacterias* son bacilos Gram-positivos, pleomórficos, no ramificados, no esporulados, catalasa positivos, oxidasa negativos, cuyo tamaño oscila entre 2-6 μm de longitud y 0.5 μm de diámetro. En función de los requerimientos de oxígeno, pueden dividirse en bacterias aerobias o anaerobias facultativas, grupo en el que se incluyen los géneros *Brevibacterium* y *Corynebacterium* respectivamente; y bacterias anaerobias o aerotolerantes, como es el caso de los géneros *Eubacterium* y *Propionibacterium*.

⁴⁶ QUIJANO, Amelia y ZULETA, Wendy. Propuesta de cinética de fermentación para la producción de ácido glutámico. San Salvador, 2006. Trabajo de grado (Licenciatura en química y farmacia). Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia

⁴⁷ GARZÓN, Sandra y HERNÁNDEZ Catalina. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Pereira, 2009. Trabajo de grado (Químico Industrial). Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Escuela de Tecnología Química. Química Industrial

⁴⁸ Ibid., p. 32

⁴⁹ FOLLMANN, Martin; OCHROMBEL, Ines; KRÄMER, Reinhard; TRÖTSCH, Christian; *et al.* Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. En: BMC Genomics. Vol. 10. (2009) p. 1-23

Las *corynebacterias* están ampliamente distribuidas en la naturaleza encontrándose en el suelo, el agua y también en la mucosa y piel del hombre y animales. Algunas especies pertenecientes a este grupo son conocidas por sus efectos patógenos en humanos y otros animales, así como por su patogenicidad en plantas. Un grupo de *corynebacterias* no patógenas presenta la capacidad de excretar ácido glutámico en grandes cantidades, por lo que al grupo se le denominó bacterias del ácido glutámico. Las especies no patógenas son utilizadas en procesos industriales de gran relevancia, como la producción de aminoácidos, producción de nucleótidos y otros factores nutricionales, bioconversión de esteroides, degradación de hidrocarburos, maduración de quesos, producción de enzimas y otros procesos con interés desde el punto de vista aplicado⁵⁰.

Corynebacterium glutamicum es un microorganismo industrial utilizado tradicionalmente para la producción de aminoácidos. Fue descubierto por primera vez como productor de glutamato. Ahora se utiliza para la producción de aminoácidos, tales como lisina, treonina e isoleucina, así como vitaminas y pantotenato⁵¹. Es un bacilo que aparece de forma individual, en parejas o formando masas irregulares; la morfología de las colonias cuando crecen sobre agar es de aspecto suave, circular y de color amarillento, siendo el rango de temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 37°C. Con respecto a los requerimientos nutricionales, todos ellos necesitan biotina para su crecimiento y algunas cepas requieren además tiamina y ácido *p*-aminobenzoico⁵².

2.2.3.1 Metabolismo de *Corynebacterium glutamicum* para la producción de ácido glutámico

Morfológica y fisiológicamente todas las cepas productoras de ácido glutámico son muy parecidas a *Corynebacterium glutamicum*, ya requieren biotina, carecen o tiene poca actividad de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa y una alta actividad de la glutamato deshidrogenasa⁵³.

La producción y excreción del exceso del aminoácido depende de la permeabilidad de la célula, por ello las cepas de uso comercial son bacterias seleccionadas a través los siguientes mecanismos:

⁵⁰ LETEK, Michal. Identificación y análisis funcional de genes implicados en el catabolismo del ácido glucónico en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. León, 2002. Trabajo de grado (Licenciatura en Biología). Universidad de León. Facultad de Biología. Departamento de Ecología, Genética y Microbiología

⁵¹ GOPINATH, Valasha y NAMPOOTHIRI Kerish. Encyclopedia of Food Microbiology. En: Scient Direct [base de datos en línea]. 2a Edición; p. 504-517 [citado en 10 de marzo de 2014]. Disponible en SCIENT DIRECT Research Databases

⁵² LETEK M., Op. cit., p. 15

⁵³ GARCÍA, Op. cit., p. 410

- ✓ Deficiencia de biotina.
- ✓ Deficiencia de ácido oleico en auxótrofos de ácido oleico.
- ✓ A través de la adición de ácidos grasos saturados.
- ✓ A través de la adición de penicilina.
- ✓ Deficiencia de glicerol en auxótrofos de glicerol.

Todas las cepas productoras de ácido glutámico tienen requerimientos de biotina para su crecimiento, la cual es una coenzima esencial en la síntesis de ácidos grasos. Si la bacteria crece en altas concentraciones de biotina, se aumenta la síntesis de ácido oleico y se tiene un alto contenido de fosfolípido en la membrana celular. El alto contenido de fosfolípido impide la excreción del ácido glutámico originando que la síntesis intracelular se detenga por retro inhibición. Si la cepa crece en un medio deficiente de biotina se reduce la síntesis de fosfolípidos y la membrana se daña llevando a una relación diferente entre ácidos grasos saturados y no saturados. En estas condiciones el ácido glutámico intracelular se excreta fácilmente⁵⁴.

En condiciones óptimas para la producción de ácido glutámico, la glucosa (fuente de carbono) es degradada por los microorganismos a fragmentos C_3 y C_2 a través de la vía glucolítica y la vía de las pentosa fosfato, y los fragmentos canalizados al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El precursor clave del ácido glutámico es el α -cetoglutarato, que se forma en el ciclo TCA vía citrato e isocitrato y luego se convierte en ácido L-glutámico por aminación reductiva con iones NH_4^+ libres (esquema 1). Esta última etapa es catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa que es NADP dependiente. El $NADPH_2$ requerido en esta etapa es proporcionado a través de la oxidación descarboxilativa previa del isocitrato a α -cetoglutarato por la enzima isocitrato deshidrogenasa. El $NADPH_2$ es luego regenerado por la aminación reductiva de α -cetoglutarato⁵⁵.

La cepa utilizada comercialmente para la producción de ácido glutámico tiene un bloqueo en la α -cetoglutarato deshidrogenasa. En ausencia de iones NH_4^+ se acumula α -cetoglutarato debido a la interrupción del ciclo del TCA. Por tanto se requieren secuencias anapleróticas eficientes para proporcionar al TCA los intermediarios que se requieren para todas las demás reacciones de la célula⁵⁶.

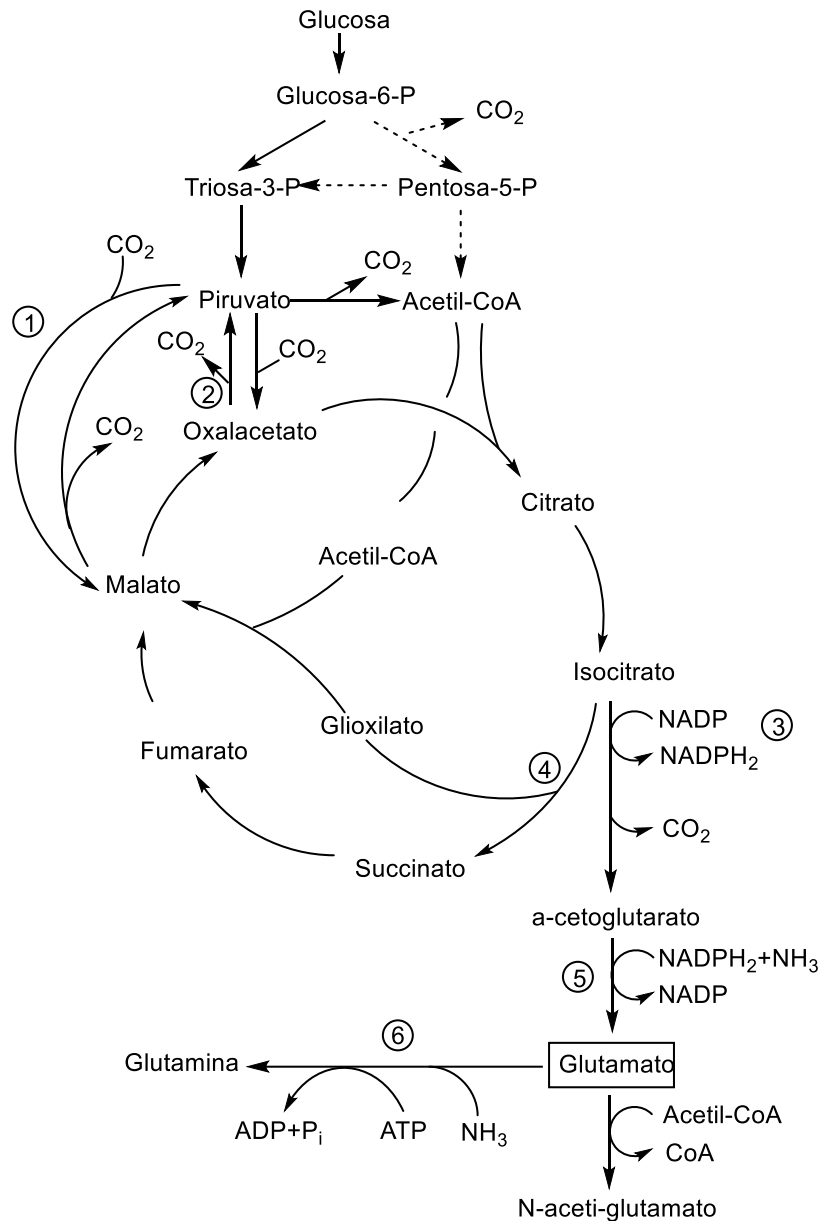
En condiciones óptimas de cultivo las bacterias que producen ácido glutámico convierten aproximadamente el 50-60% de la fuente de carbono añadida en el aminoácido. Si se utilizan condiciones de fermentación menos favorables, de forma que se obtenga una baja producción de ácido glutámico, se ha observado un aumento en la masa celular y secreción de lactato, succinato, α -cetoglutarato,

⁵⁴ GÓMEZ, Op. cit., p. 24

⁵⁵ CRUEGER, Op. cit., p. 184

⁵⁶ Ibid., p. 180-181

glutamina y N-acetilglutamina⁵⁷.



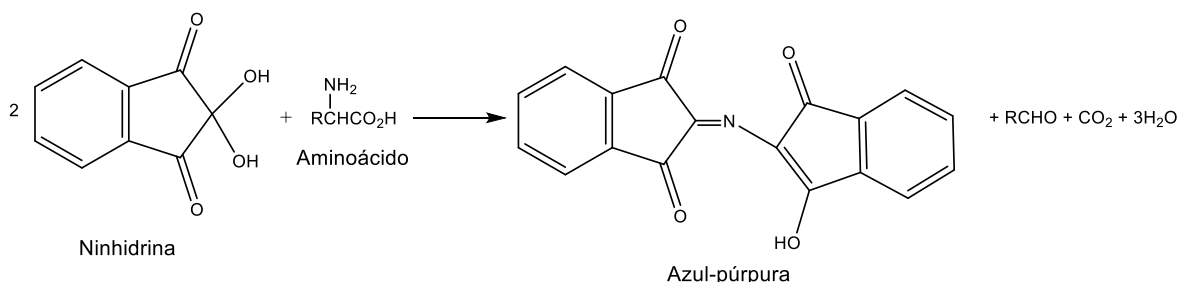
Esquema 1: Biosíntesis de ácido glutámico utilizando glucosa como fuente de carbono. Ciclo del ácido glicólico, línea fina: ciclo de las pentosa fosfato. Líneas discontinuas. 1) Enzima málica 2) Oxalacetato carboxilasa 3) Isocitrato deshidrogenasa 4) Isocitrato liasa 5) Ácido glutámico deshidrogenasa 6) Glutamina sintetasa
Fuente: CRUGER. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. 1993

⁵⁷ OWEN, Op. cit., p. 190

2.2.4 Métodos de identificación y purificación de aminoácidos

El estudio y caracterización de las distintas biomoléculas como los aminoácidos, requiere en numerosos casos su aislamiento y purificación a partir de mezclas complejas como los preparados de cualquier material biológico. Los métodos más usados en la identificación de los aminoácidos son los colorimétricos, los cuales se basan en la reacción específica de éstos con determinados compuestos, dando derivados coloreados. Estas reacciones pueden también ser utilizadas para la determinación cuantitativa de estas biomoléculas⁵⁸.

El método más general y utilizado es el de la reacción con ninhidrina. La ninhidrina reacciona con aminoácidos que tengan el grupo amino libre, dando lugar a la formación de amoniaco y anhídrido carbónico con reducción del reactivo a hidrindantina. Ésta reacciona a su vez con el amoniaco y otra molécula de ninhidrina para dar un compuesto de adición doble que presenta una coloración azul-púrpura (esquema 2). El derivado coloreado presenta máximo de absorción a 570 nm. La técnica es muy sensible, por lo que es ideal para detectar concentraciones bajas de aminoácidos, utilizándose para revelar su presencia en cromatogramas y fracciones procedentes de otras técnicas de separación⁵⁹.



Esquema 2: Reacción de aminoácidos con ninhidrina

Fuente: JORRIN. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina. 2010

Los métodos modernos de identificación de aminoácidos se basan en procesos cromatográficos, en donde las muestras se analizan generalmente mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o la cromatografía de gases (GC),

⁵⁸ JORRÍN, Jesús; ABRIL, María y BÁRCENA, José. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina [en línea] <<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/11%20CROMATOGRAF%C3%8DA%20DE%20CAPA%20FINA%20DE%20AAs.pdf>> [citado en 22 de febrero de 2014]

⁵⁹ Ibid., p. 5

las cuales utilizan como fase móvil un gas o un líquido respectivamente logrando la separación de las sustancias puras⁶⁰.

No obstante, la naturaleza polar de aminoácidos requiere un proceso de derivatización antes de los análisis cromatográficos. El objetivo de derivatización es hacer un analito más volátil, menos reactivo, y de este modo mejorar su comportamiento cromatográfico. En el caso de los aminoácidos, la derivatización reemplaza los hidrógenos activos de los grupos OH, NH₂, SH (grupos funcionales polares) por un fragmento no polar⁶¹. Cabe resaltar que los procesos de derivatización varían dependiendo de las condiciones de análisis.

En el caso de análisis por HPLC generalmente se usa el método denominado Pico-Tag, el cual se basa en la derivatización pre-columna de los aminoácidos con fenilisotiocianato (PITC) para producir los feniltiocarbamil aminoácidos que son analizados por HPLC en fase reversa. Los PITC aminoácidos presentan un máximo de absorción a 254 nm. La columna que se utiliza es una “Pico-Tag” (C18), mantenida a 46°C⁶².

Este método está diseñado para un aparato de HPLC con una o dos bombas con la capacidad de crear gradientes de elución de dos sistemas de disolventes. En el proceso se establece un gradiente de eluyentes que se inicia con el eluyente A, el cual desplaza inicialmente de la columna los aminoácidos más polares. Se produce un aumento gradual del porcentaje de un eluyente apolar B, con lo que aumenta la apolaridad de la fase móvil, produciéndose un desplazamiento gradual de la columna de los aminoácidos más hidrofóbicos. Al final, el 100% de la fase móvil pasa a ser del eluyente B. En la última parte de la cromatografía, la fase móvil pasa del 100% de B al 100% de A; así la columna queda limpia y estabilizada para realizar la siguiente cromatografía⁶³.

Por su parte en análisis por cromatografía de gases la sililación es una técnica de derivatización más utilizada, y es útil para una amplia variedad de compuestos. La principal desventaja de este método es su sensibilidad a la humedad. La presencia de humedad resulta en una pobre eficiencia de reacción y la inestabilidad de los analitos derivados (pueden hidrolizarse). Para este tipo de análisis, se aplica principalmente el reactivo de sililación N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA). MTBSTFA, forma grupos terc-butildimetilsililo (TBDMS) cuando reaccionan con grupos funcionales polares que contienen

⁶⁰ VOET, Judith y VOET, Donald. Bioquímica. Madrid, España. Reverté, 2006. p. 452

⁶¹ POOLE, Colin. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. En: J. Chromatogr. A. Vol. 7 (2013) p. 2-14

⁶² ROCA, Pilar; OLIVER, Jordi y RODRIGUEZ, Ana M. Bioquímica. Técnicas y Métodos. España. Editorial Hélice, 2003. p. 144–146

⁶³ Ibid., p. 145

hidrógenos activos. Los datos cromatográficos obtenidos a partir de las señales, permiten la identificación de los derivados de cada aminoácido⁶⁴.

El empleo de la cromatografía en capa fina (CCF o TLC) también desempeña un papel indispensable en el análisis bioquímico y constituye una técnica de gran utilidad para la separación y posterior identificación de aminoácidos. Esta presenta una serie de ventajas respecto a cromatografías alternativas, por ejemplo: i) una mayor resolución, obteniéndose por lo general manchas más pequeñas. ii) una mayor velocidad de separación. iii) pueden utilizarse un gran número de materiales como soportes y disolventes. iv) los compuestos pueden ser detectados con facilidad y su recuperación es muy simple⁶⁵.

Puesto que los procesos fermentativos conllevan a la obtención de subproductos no deseados además de material celular o residuos de glucosa, se hacen necesarias técnicas o procesos que permitan purificar el producto final. Una técnica usada ampliamente en la purificación de aminoácidos es la cristalización, en donde se usan solventes orgánicos para la obtención del sólido de alta pureza⁶⁶.

2.2.5 Sustrato: Raquis de palma africana

La palma africana o palma de aceite (*Elaeis guineensis*) es originaria del bosque tropical del Oeste de África⁶⁷; cuyos cultivos han sido de los más desarrollados en Colombia, ocupando el cuarto lugar en la producción de aceite a escala mundial y el primer lugar en Latinoamérica y se perfila como uno de los de mayor futuro. La palma se ha adaptado muy bien a las condiciones climáticas y agronómicas de la región y se constituye en uno de los sectores de agroindustria con más alto crecimiento y de mayor desarrollo relativo en el país. Anualmente en la zona palmicultora del departamento de Nariño se genera una alta cantidad de residuos sólidos orgánicos a partir de la extracción de aceite de palma, no sólo durante el beneficio sino durante el proceso de corte y cosecha. La mayoría de estos residuos son material vegetal tales como hojas, pedúnculos, nueces, cuesco y raquis. Estos últimos, son las estructuras que soportan en las inflorescencias de la palma de aceite: los folíolos y las espiguillas, también se conocen como tusas y son

⁶⁴ HERRERA, Fredy; LEÓN, Guillermo y LLANO, Natalia. Efectos del tratamiento térmico sobre el perfil de aminoácidos libres en jamón de cerdo envasado en película retortable. Caldas – Antioquia, 2013. Tesis (Especialización en Alimentación y Nutrición). Corporación Universitaria Lasallista. Facultad de Ingenierías

⁶⁵ JORRÍN, Op. cit., p. 4

⁶⁶ SÁNCHEZ, Antonio. Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Barcelona, 1998. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Biotecnología.

⁶⁷ SULAIMAN, Othman; SALIM, Nurjannah; AFEEFAH, Noor; HASHIM, Rokiah; IBRAHIM, Mazlan y SATO, Masatoshi. The Potential of Oil Palm Trunk Biomass as an Alternative Source for Compressed Wood. En: Bioresource Vol. 7 (2012) p. 2688-2706

generados por el proceso en la etapa del desfrutamiento⁶⁸.



Figura 1: Raquis de palma africana

Fuente: INFOAGRO disponible en: www.infoagro.com. Visitada 02 12 2015

2.2.5.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la palma africana según Hutchinson⁶⁹ se indica a continuación:

Tabla 3: Clasificación taxonómica de la palma africana

División	Fanerógama
Tipo	Angiosperma
Clave	Monocotiledoneas
Orden	Palmales
Familia	Palmaceae
Tribu	Cocoina
Género	Elaeis
Especie	guineensis

Fuente: TECHNOSERVER. Manual Práctico de Palma Africana. 2009

⁶⁸ SANTOS, Op. cit., p. 36

⁶⁹ TECHNOSERVE. Manual Técnico de Palma Africana. [en línea]
<<http://palma.webcindario.com/manualpalma.pdf>> [citado en 27 de junio de 2016]

2.2.5.2 Composición y productos de los racimos de palma africana

Los racimos de fruto fresco son cosechados para su procesamiento y obtención del aceite. No obstante, estos se encuentran constituidos por tusa o raquis, en un 35%, y tan solo un 65% de racimo constituye los frutos para procesar y extraer aceite. A continuación se indica la composición del racimo y el porcentaje de raquis dentro del mismo⁷⁰:

Tabla 4: Composición y productos de los racimos de palma africana

RACIMO	Fruto 65%	Pulpa o mesocarpio 62%	Aceite de palma crudo 45%	Aceite de palma refinado 94%	Oleína Estearina	
				Residuos 6%		
			Fibra 55%			
		Nuez 38%	Almendra o palmiste 30%	Aceite de palmiste crudo 43%	Aceite refinado de palmiste 85%	
					Residuos 15%	
				Total de palmiste 50%		
				Residuos 7%		
				Cáscara 70%		
		Tusa o raquis 35%				

Fuente: CORPODIB. Análisis Socioambiental de la Implementación del Programa de Biodiesel en Colombia. 2009

2.2.5.3 Composición química del raquis de la palma

La composición química del raquis es bastante heterogénea, consistiendo principalmente de tres materiales poliméricos: celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos materiales están compuestos por moléculas de gran tamaño que constituyen del 95 al 98% de la pared celular. El restante 2-5% son componentes de bajo peso

⁷⁰ CORPODIB. Análisis Socioambiental de la Implementación del Programa de Biodiesel en Colombia [en línea] <<http://www.si3ea.gov.co/si3ea/documentos/documentacion/Biodiesel/Capitulo%203.pdf>> [citado en 15 de marzo de 2014]

molecular denominados extractivos⁷¹. No obstante, la cantidad de estos componentes puede variar considerablemente de acuerdo a las condiciones climáticas, composición del suelo, etc.⁷².

Piarpuzan *et al.* reportan que la composición media de celulosa en los racimos es del 13,75%, mientras que la hemicelulosa se encuentra en un porcentaje del 12,79%⁷³.

Tabla 5: Composición media de racimos de palma africana

Componente	Contenido (peso, %)
Celulosa	13.75 \pm 0.44
Hemicelulosa	12.79 \pm 0.40
Lignina	7.79 \pm 0.08
Cenizas	0.63 \pm 0.04
Humedad	65.04 \pm 1.80

Fuente: PIARPUZAN. Empty fruit bunches from oil palm as a potential raw material for fuel ethanol production. 2011

⁷¹ BAYONA, Op cit., p. 6

⁷² KHIARI, Ramsey; MHENNI, Marcio; BELGACEM, Merdhas y MAURET Eleanor. Chemical composition and pulping of date palm rachis and Posidonia oceanica – A comparison with other wood and non-wood fibre sources. En: Bioresource Technol. Vol. 101 (2010) p. 775–780

⁷³ PIARPUZÁN, Op cit., p. 1131

3 METODOLOGÍA

3.1 MUESTREO

La muestra de raquis de palma de aceite, se recolectó en la Planta Extractora Santa Fe SAS, ubicada en la zona palmicultora del Municipio de Tumaco, región que presenta una altitud de 2 m.s.n.m y se encuentra ubicada a 300 km de la ciudad de San Juan de Pasto en el departamento de Nariño (figura 2).

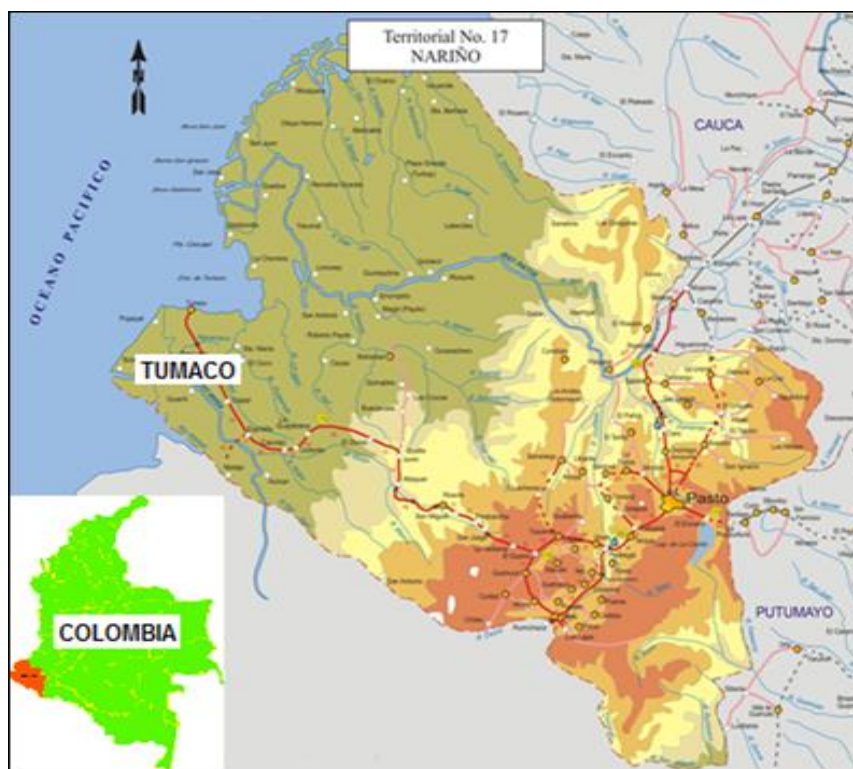


Figura 2: Ubicación de la región del departamento de Nariño donde se realizó el muestreo
Fuente: GOBERNACIÓN DE NARIÑO disponible en: http://www.zonu.com/South-America/Colombia/Narino/Road_en.html. Visitada 02 12 2014

En el mes de enero del año 2015, se recolectaron 4 racimos del material lignocelulósico (figura 3) de la bodega de almacenamiento de la planta extractora, por medio de muestreo completamente aleatorizado y se trasladaron al laboratorio del Grupo de Investigación de Bioquímica y Estudios Genéticos - BIOGEN de la Universidad de Nariño.

Se separó cada espiga de los racimos y se secaron a temperatura ambiente por 5 días. Posteriormente las espigas se desfibraron una licuadora industrial JAVAR y el material vegetal se secó a 60°C por 48 horas. Finalmente se molió en un molino de martillos Nossen 50958 y se homogenizó la muestra total. Esta fue conservada en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente protegida de la humedad para ser utilizada posteriormente en los diferentes tratamientos.



Figura 3: Raquis de palma africana recolectado
Fuente: Esta investigación

3.2 HIDRÓLISIS ÁCIDA

Para obtener los azúcares reductores del raquis de palma de aceite y usarlos como sustrato del microorganismo *Corynebacterium glutamicum* en la obtención de ácido L-glutámico, se utilizó un sistema de reflujo operado a condiciones atmosféricas, como se indica en la figura 4, en donde la temperatura de hidrólisis se mantuvo a 85°C usando baño maría.

Siguiendo la metodología empleada por Gómez y Lagos⁷⁴, se adicionó H₂SO₄ diluido al raquis previamente preparado. En diferentes tratamientos, se utilizaron concentraciones de ácido de 2%, 4% y 6% en una relación 1/30 (peso de muestra seca/volumen de ácido diluido), operando durante un tiempo de 4, 6 y 8 horas para tres réplicas por cada tratamiento en una concentración determinada del ácido.

⁷⁴ GÓMEZ, Op. cit., p. 34-35

Los hidrolizados se filtraron para separar las fibras de raquis, se decoloraron con carbón activado y se guardaron en frascos ámbar bajo refrigeración para ser utilizados posteriormente en el proceso fermentativo.

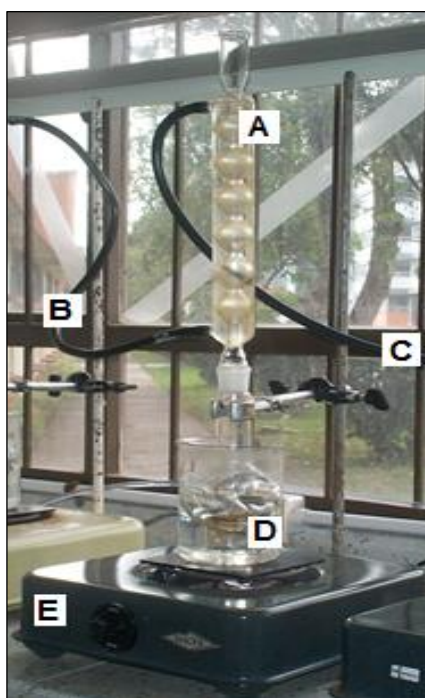


Figura 4: Montaje utilizado en el proceso de hidrólisis ácida (sistema de reflujo operado a condiciones atmosféricas) A) Condensador B) Entrada de agua C) Salida de agua D) Baño maría E) Fuente de calor
Fuente: Esta investigación

Para determinar las mejores condiciones de extracción de azúcares reductores se desarrolló un diseño experimental factorial 3^2 , donde las variables a analizar fueron concentración de ácido y tiempo de hidrólisis, y como variable de respuesta se obtuvo la concentración de azúcares reductores en cada proceso. Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I

Los azúcares reductores obtenidos en cada tratamiento se cuantificaron empleando el método de Miller⁷⁵, para lo cual fue necesario construir una curva de calibración usando un patrón de glucosa 4 g/L y ácido 3,5 dinitrosalicílico (Anexo I A).

⁷⁵ MILLER, Gail. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. En: Anal. Chem. Vol. 31 (1959) p. 426-428

3.3 MICROORGANISMO

El microorganismo fermentador utilizado en esta investigación fue la cepa bacteriana *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, cuyas características generales se indican en la tabla 6.

Tabla 6: Características generales de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Organismo	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
ATCC	13032
Designación de la cepa	534 [NCIB 10025]
Nivel de bioseguridad	1
Forma de envío	Vial liofilizado
Medio	ATCC medio 3: Agar nutritivo o caldo nutritivo
Condiciones de crecimiento	Temperatura: 37°C Ambiente: Aeróbico
Condiciones de almacenaje	Congelado: -80°C o menos Liofilizado: 2°C a 8°C
Aplicaciones	Produce ácido L-glutámico

Fuente: American Type Culture Collection [ATCC]. 2014

3.3.1 Activación

La cepa bacteriana de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 se activó bajo condiciones asépticas en la cabina de flujo laminar C4 FLC85 en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño; para ello se hidrató con 1 mL de caldo nutritivo (Oxoid CM 0001, Anexo B), se agitó fuertemente hasta total disolución y se transfirió a un tubo falcon con 9 mL del caldo, formando la solución madre.

3.3.2 Almacenamiento

De la solución madre se tomaron 5 alícuotas de 500 µL y se transfirieron respectivamente a microtubos previamente preparados con 500 µL de una solución

60% glicerol - 40% caldo nutritivo y se llevaron a congelación a -4°C para su almacenamiento y conservación⁷⁶.

3.3.3 Conservación del microorganismo

Para la conservación del microorganismo se utilizó el método de siembra por agotamiento o estría⁷⁷. Para ello, de la solución madre se tomó una alícuota del cultivo bacteriano con isópo estéril y se realizaron siembras en la superficie del medio sólido (agar nutritivo Oxoid CM 0003, Anexo C) preparado previamente en diferentes cajas de Petri. Las siembras se llevaron a incubación por 24 horas a 37°C en una incubadora de convección DIES K53 y posteriormente se conservaron en refrigeración a 4°C. Para mantener activa la bacteria se hicieron repiques cada ocho días en agar y caldo nutritivo, bajo las condiciones de incubación antes mencionadas y se almacenaron a 4°C bajo condiciones asépticas.

Con uno de los cultivos se realizaron ensayos macro y microscópicos para comprobar las características primarias de la bacteria, como tipo de crecimiento del microorganismo, color, morfología y tinción de Gram.

3.4 PROCESO DE FERMENTACIÓN

3.4.1 Determinación del perfil cinético de la cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Para determinar el tiempo en que la cepa alcanza el valor máximo de su fase exponencial, se determinó la cinética de crecimiento bacteriano con lo cual se garantizó el mayor número de células viables presentes en los cultivos.

Para ello, se inocularon cinco colonias del microorganismo en 50 mL de caldo nutritivo⁷⁸ contenidos en un frasco tapa rosca el cual se llevó a incubación a una temperatura entre 35 y 37°C. Para cuantificar la biomasa se utilizó el método turbidimétrico en donde se midió la absorbancia a 600 nm de alícuotas de 1 mL en un espectrofotómetro UV-Vis Merck Spectroquant PHARO 300 cada dos horas por

⁷⁶ BEECH, Freemy y DAVENPORT Ray. Methods in Microbiology: Isolation, purification and maintenance of yeasts. London. Academic Press, 1971. p. 153-182

⁷⁷ ROJAS, Alberto. Conceptos y práctica de microbiología general. Palmira. Universidad Nacional de Colombia, 2011. p.50

⁷⁸ HERNÁNDEZ, Armando; GONZALES, Yenisey; FRÓMETA, Claudia y CALZADA, Rafael. Parámetros cinéticos y simulación del proceso fermentativo de la cepa atenuada 638 de *Vibrio cholerae*. En: Revista CENIC. Vol. 3 (2012) p. 245-252

un periodo de tiempo de 48 horas⁷⁹. Además, se determinó el número de bacterias presentes en la alícuota que presentó el máximo valor de absorbancia mediante el método de conteo con cámara de Neubauer, para lo cual se realizó una dilución 1:10 de la alícuota y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} * 10.000}{\text{número de cuadros} * 0,1^{80}}$$

3.4.2 Biorreactor

El proceso de fermentación se realizó utilizando erlenmeyers de 250 mL como biorreactores, los cuales se taparon con corchos dihoradados a los cuales se adaptaron dos mangueras de silicona, una para la adición de NH₄OH 25% (solución neutralizante) y otra para tomar alícuotas del fermento permitiendo realizar controles de pH, consumo de fuente de carbono y producción del aminoácido (figura 5). Durante todo el proceso de fermentación los orificios externos de las mangueras se mantuvieron cerrados con motas de algodón para evitar posibles contaminaciones.

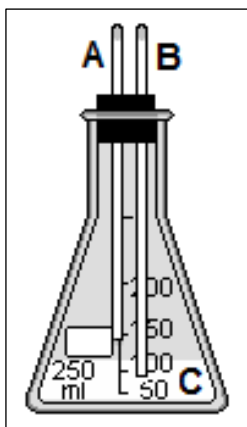


Figura 5: Diseño del biorreactor utilizado en el proceso fermentativo A) Orificio de entrada solución neutralizante B) Orificio para la toma de muestra C) Volumen del fermento
Fuente: Esta investigación

⁷⁹ HAYNES, Jill y BRITZ, Margaret. The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency obtained by electroporation. En: J Gen Microbiol. Vol. 136 (1990) p. 255-263

⁸⁰ CELEROMICS. Conteo celular con Hematocitómetro. < <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/Como-contar-celulas-con-camara-de-Neubauer.php> > [en línea] [citado en 14 de febrero de 2016]

3.4.3 Proceso de fermentación

Para llevar a cabo el proceso de fermentación se utilizó como fuente de carbono los azúcares reductores presentes en el hidrolizado cuyas concentraciones fueron variables. De estos hidrolizados se tomó el volumen necesario para estandarizar la concentración total en el biorreactor a 1 g/L para los tratamientos T1 y T2 y una concentración de 0,5 g/L para los tratamientos T3 y T4, los cuales se llevaron a un volumen final de 120 mL

Como fuente de nitrógeno se utilizó sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en dos concentraciones; para los tratamientos T1 y T3 15 g/L y para los tratamientos T2 y T4 7 g/L. Además, se realizaron fermentaciones testigo utilizando glucosa como patrón en iguales concentraciones. También se agregaron los micronutrientes necesarios para la biosíntesis del aminoácido y el mantenimiento celular de acuerdo a la metodología planteada por Amin *et al.*⁸¹ como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 7: Fuente de carbono, nitrógeno y micronutrientes utilizados en el proceso de fermentación para la producción de ácido glutámico

FUENTE DE CARBONO		(NH ₄) ₂ SO ₄		TRATAMIENTOS
	CONCENTRACIÓN en 120 mL (g/L)	CONCENTRACIÓN en 120 mL (g/L)	CANTIDAD (g)	
Hidrolizado raquis de Palma Africana	1	15	9	T1
		7	4	T2
	0,5	15	9	T3
		7	4	T4
Glucosa	1	15	9	T1`
		7	4	T2`
	0,5	15	9	T3`
		7	4	T4`
MICRONUTRIENTES				CONCENTRACIÓN en 120 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O				5,1 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O				5ppm
MnSO ₄ .7H ₂ O				5 ppm
K ₂ HPO ₄				1 g/L
K ₂ SO ₄				1 g/L
Biotina				0,041ppm
Tiamina				6,6x10 ⁻³ ppm

Fuente: AMIN. Production of L-glutamic acid by immobilized cell Reactor of the bacterium *Corynebacterium glutamicum* entrapped into Carrageenan gel beads. 2007

⁸¹ AMIN, Gaudí. y AL-TALHI, Almezher. Production of L-glutamic acid by immobilized cell Reactor of the bacterium *Corynebacterium glutamicum* entrapped into Carrageenan gel beads. En: World Appl Sci J Vol. 1 (2007) p. 62-67

De acuerdo la metodología planteada por el mismo autor⁸², los nutrientes del medio de fermentación se prepararon por separado, teniendo en cuenta dos aspectos importantes: 1) evitar la reducción del sulfato de amonio al respectivo sulfito que produce una coloración marrón por la presencia de glucosa y la exposición a las altas temperaturas del proceso de esterilización y 2) evitar la reducción del manganeso que produce una coloración violeta cuando se encuentra en medio ácido a altas temperaturas.

Tabla 8: Composición de los medios A y B

Medio A	Medio B
<ul style="list-style-type: none"> • Fuente de carbono • K_2SO_4 0,12g • $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,62g • $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,6mg • $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,6mg 	<ul style="list-style-type: none"> • Fuente de nitrógeno • K_2HPO_4 0,12g • Tiamina 0,8mg • Biotina 5μg

Los micronutrientes del medio A y B se disolvieron con agua destilada y se adicionó a cada medio la fuente de carbono y fuente de nitrógeno respectivamente completando un volumen de 40 mL para cada uno y se esterilizaron en autoclave a 120°C por 15 minutos. A continuación los medios fueron transferidos asépticamente al biorreactor, se fijó el pH en 7.5 con NH_4OH 25% y finalmente se inocularon con 10 mL de cultivo bacteriano incubado previamente por 34 horas para completar un volumen final de 120 mL. En el proceso fermentativo se mantuvo una temperatura de 35°C, pH 7,5 y agitación constante a 180 rpm (figura 6) asegurando con esto la distribución homogénea de oxígeno y nutrientes en el medio; cabe mencionar que se llevó a cabo un total de dos réplicas para cada tratamiento.

Para determinar el mejor tratamiento en la recuperación de ácido L-glutámico se desarrolló un diseño factorial completo 2^2 usando el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I, donde las variables a analizar fueron concentración de fuente de carbono y fuente de nitrógeno y como variable respuesta se obtuvo la concentración de aminoácido obtenido en cada tratamiento.

⁸² Ibid., p. 62

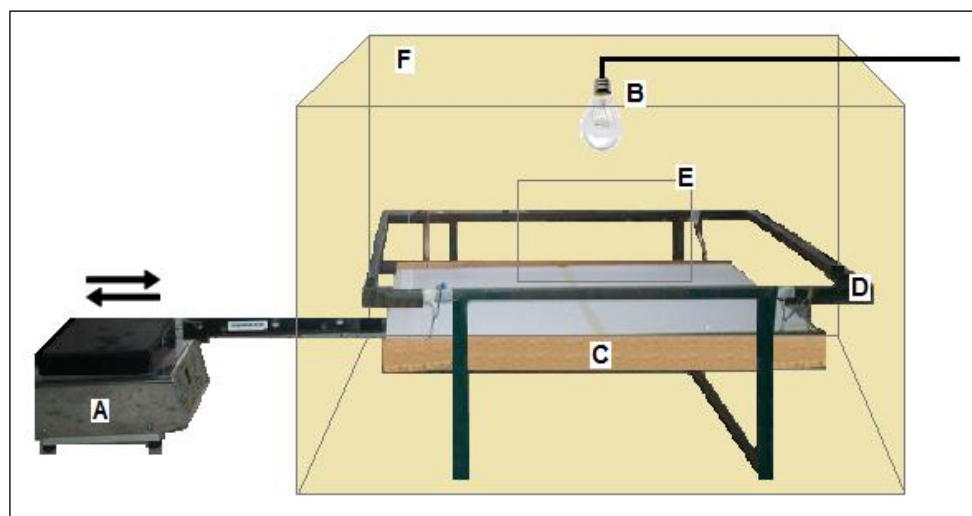


Figura 6: Montaje utilizado en el proceso de fermentación para la producción de ácido glutámico A) Agitador B) Bombilla C) Balancín D) Soporte metálico E) Ventana de monitoreo F) Caja

Fuente: Esta investigación

El proceso fermentativo se llevó a cabo por un periodo de 96 horas en donde se realizaron controles cada 24 h, tomando un total de 5 alícuotas de 1 mL del caldo de fermentación para cuantificar el consumo de azúcares y la producción del aminoácido. Los azúcares residuales fueron cuantificados por el método de Miller⁸³, mientras que el aminoácido obtenido se cuantificó con reactivo de ninhidrina (Anexo D) de acuerdo a la metodología planteada por Amin *et al.*⁸⁴

3.4.4 Recuperación y purificación de ácido glutámico

Terminado el proceso fermentativo se fijó el pH de los fermentos en 9.5 con la adición de NaOH en granallas. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min⁸⁵ para separar el material celular del sobrenadante; este último se decoloró con carbón activado, se filtró y se acidificó con HCl 4N hasta alcanzar el punto isoelectrico del ácido glutámico (3.1) medido con un pH- metro Metrohm 691

A continuación, se concentró la fase líquida a una temperatura de 70°C hasta alcanzar la quinta parte del volumen inicial y se dejó precipitar a temperatura

⁸³ MILLER, Op. cit., p. 427

⁸⁴ AMIN, Op. cit., p. 63

⁸⁵ VIJAYALAKSHMI, Payala y SARVAMANGALA, Dhurjeti. Production of L-Glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300T and *Arthrobacter globiformis* MTCC 4299 using fruits of *Muntingia calabura* Linn. En: Int. Res. J. Microbiol. Vol. 4 (2011) p. 116-121

ambiente formando cristales, los cuales se aislaron por filtración a gravedad, se secaron a 60°C y finalmente se pesaron para determinar el rendimiento del proceso. Para asegurar su pureza, se realizaron varias recrystalizaciones con una mezcla etanol-agua en relación 0,7:2. Finalmente, para verificar la pureza de los cristales obtenidos, se utilizó cromatografía en capa delgada con placas de sílica gel como fase estacionaria, una mezcla de solventes n-butanol/ácido acético/agua en relación 8:2:2 (v/v) como fase móvil y reactivo de ninhidrina como revelador⁸⁶.

3.5 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACION

3.5.1 Análisis mediante cromatografía de gases (GC-FID)

El ácido glutámico obtenido del proceso de fermentación se analizó por cromatografía de gases con detector de ionización de llama usando un cromatógrafo Shimadzu GC-17AV3 equipado con una columna ZB-5ms (30 m de longitud x 0,25mm de diámetro interno x 0,25 µm de tamaño de partícula). Para ello, se pesaron 10 mg del aminoácido, se disolvieron en 500 µL de HCl 0.1M y se llevaron a sequedad con corriente de nitrógeno, para lo cual se acopló una manguera de venoclisis a la válvula y se dejó circular el gas dentro del vial en el que se encontraba contenida la muestra. A continuación se adicionaron 70 µL del derivatizante MTBSTFA y 70 µL de acetonitrilo HPLC. Seguidamente, la solución se llevó a un termorreactor Merck Spectroquant TR620 a 75°C durante 30 minutos; completada la reacción se procedió a la inyección de 1 µL de la muestra derivatizada en el sistema GC-FID bajo las condiciones indicadas en la tabla 9. El ácido L-glutámico usado como patrón de referencia SIGMA-ALDRICH con una pureza ≥ 99% se trató bajo las mismas condiciones.

Tabla 9: Condiciones de inyección de la muestra al sistema GC-FID

Programación de Temperatura	Se inició en 100°C (1min) hasta llegar a 290°C a 35°C/min Posteriormente se incrementó a 310°C (5 min) a 40°C/min.
Temperatura del detector FID	310°C
Temperatura de inyector	280°C modo de inyección <i>splitless</i> .
Flujo de gas de arrastre	Helio a 1,0 mL/min

Fuente: GÓMEZ. Obtención y purificación de ácido glutámico a partir de hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique fermentables por la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. 2013

⁸⁶ Ibid., p. 118

3.5.2 Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-PDA)

Para una mejor identificación del producto obtenido, se realizó un análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia usando un cromatógrafo Waters Breeze equipado con bomba binaria 1525, detector PDA 2998 y una columna C18 Kinetex Phenomenex (250 x 4,6 mm x 5,0 μ m). Para ello se pesaron 1,5 mg de la muestra y se disolvieron en 1 mL de HCl 0,1N, de esta solución se tomaron 50 μ L y se llevaron a sequedad con corriente de nitrógeno de igual forma que en la preparación para cromatografía de gases. A continuación se adicionaron 20 μ L de la solución derivatizante PITC, se agitó por 5 min y se disolvió con 400 μ L de buffer fosfato a pH 3.0. Finalmente se procedió a inyectar 20 μ L de la muestra en el sistema HPLC bajo las siguientes condiciones de análisis:

Tabla 10: Condiciones de análisis de la muestra mediante HPLC-PDA

Modo de separación en gradiente Flujo: 1mL/min	
Fase móvil A	Buffer fosfato 25 mM pH 3,0
Fase móvil B	Acetonitrilo-agua (60:40)
Determinación simultánea: $\lambda = 254$ $\lambda = 230$	

Fuente: EDMAN. Preparation of phenylthiohydrantoin from natural amino acids. 1950

La metodología empleada en el análisis fue implementada en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño de acuerdo con la metodología descrita por Edman *et al.*⁸⁷

⁸⁷ EDMAN, Pehr. Preparation of phenylthiohydrantoin from natural amino acids. En: Acta. Chem. Scand. Vol. 4 (1950) p. 277-282

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La preparación de muestras de tejidos vegetales como el raquis es importante para obtener resultados analíticos confiables, ya que sustancias extrañas como partículas de polvo o residuos de aplicaciones foliares podrían influir en los resultados. De esta forma la muestra obtenida después del proceso de secado y molienda presentó un aspecto fibroso, inodora y color marrón claro como se indica en la figura 7.



Figura 7: Fibras de raquis obtenidas del proceso de secado y molido

Fuente: Esta investigación

El proceso de secado es de vital importancia debido a que con esto se logra eliminar la humedad del material vegetal, evitando que se lleven a cabo transformaciones que involucren cambios en su composición química; de esta forma se promueve el mantenimiento de los componentes de las fibras vegetales y se evita el crecimiento y proliferación de microorganismos con la consecuente aparición de productos indeseables que afecten su conservación. No obstante, altas temperaturas en el proceso de secado pueden causar daño térmico y cambios severos en las propiedades físicas, químicas y organolépticas de las fibras vegetales⁸⁸, ocasionando pérdidas en la obtención de azúcares, mientras que bajas temperaturas podrían dificultar el proceso de molienda.

⁸⁸ AN, Kejing; ZHAO, Dandan; WANG, Zhengfu; WU, Jijun; XU, Yujuan y XIAO, Gengsheng. Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. En: Food Chem. Vol. 197 (2016) p. 1292-1300

Terminado el proceso de secado y molienda de las fibras se obtuvo una muestra homogénea libre de residuos de material no deseado, la cual se almacenó en un lugar fresco y seco.

4.2 RESULTADO DE LA HIDRÓLISIS

Para la obtención de la mayor cantidad de azúcares reductores a partir del raquis de palma se llevaron a cabo diferentes tratamientos variando la concentración de ácido sulfúrico y tiempo de hidrólisis para un total de 27 tratamientos cuyos datos se compilan en el Anexo E.

En la tabla 11 se indican las concentraciones promedio de azúcares reductores que se obtuvieron en el proceso de hidrólisis a diferentes tiempos de reacción y concentraciones de ácido, usando la ecuación obtenida en la curva de calibración (Anexo A). Se puede observar que de manera general la concentración de azúcares es directamente proporcional al tiempo de hidrólisis; así a un tiempo de 8 horas se logró obtener la mayor cantidad de azúcares usando concentraciones de ácido del 2% (3,599 g/L) y 6% (3,873 g/L), excepto para los tratamientos donde la concentración de ácido utilizada fue del 6% en donde la mayor concentración de azúcares se obtuvo a un tiempo de 6 horas (3,576 g/L).

Tabla 11: Concentraciones de azúcares totales promedio resultado de la hidrólisis ácida de raquis de palma africana

CONCENTRACIÓN DE H_2SO_4	TIEMPO DE HIDRÓLISIS (h)	CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES TOTALES (g/L)
2%	4	3,119
	6	3,322
	8	3,599
4%	4	3,045
	6	3,776
	8	3,873
6%	4	2,882
	6	3,576
	8	3,270

Fuente: Esta investigación

Mediante el análisis estadístico se determinaron que efectos principales que influyeron directamente en el proceso. Así, se obtuvo un valor-P menor a 0,05 únicamente para la variable tiempo, por lo cual se considera que este factor es el único que tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de azúcares con un 95,0% de nivel de confianza; por consiguiente, la cantidad de

azúcares no depende de la concentración de ácido utilizada sino únicamente del tiempo de hidrólisis.

Teniendo en cuenta lo anterior, se eligió trabajar con una concentración de ácido del 2%. Este hecho se puede justificar en dos aspectos importantes: 1. economizar el gasto de ácido, puesto concentraciones más altas implicaría un mayor costo en el proceso sin un aumento significativo de la concentración de azúcares obtenidos. 2. en estudios realizados por Rahman *et al.*⁸⁹ sobre la producción de xilosa a partir de raquis de palma usando ácido sulfúrico diluido en un rango de concentraciones del 2% al 6% y posteriores estudios sobre la optimización de la hidrólisis, se encontró que a una concentración del 2% se obtuvieron mayores concentraciones de azúcares reductores; además, estudios anteriores realizados por Chiesa *et al.*⁹⁰ quienes usaron raquis de palma de aceite como materia prima para la producción de bioetanol, reportan que concentraciones de ácido superiores al 2% pueden ser perjudiciales para el proceso de sacarificación. Por su parte, Gupta *et al.*⁹¹ explican que cualquier incremento adicional en la concentración de ácido causa un aumento de la liberación de algunos compuestos tóxicos o inhibidores como el ácido levulínico (LA) o el ácido acético que fueron encontrados en cantidades de 9,27 g/L y 4,36 g/L por Chin *et al.*⁹² quienes llevaron a cabo un estudio sobre el modelo cinético de la hidrólisis ácida de raquis de palma africana; resultando esto en una disminución de la concentración de azúcares totales.

Por otra parte, para establecer el mejor tiempo de hidrólisis, se realizó una prueba estadística de múltiples rangos (Anexo G). A partir de ello se obtuvo que entre los tiempos de 6 y 8 horas no hay una diferencia significativa por lo cual se eligió trabajar con un tiempo de hidrólisis de 6 horas. Cabe mencionar que altas temperaturas mayores a 200°C y prolongados tiempos de reacción, generan un gran impacto en la formación de productos de degradación entre los cuales se encuentran principalmente el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)⁹³ (inhibidores potenciales), que cuando se encuentran presentes en los hidrolizados inhiben los procesos fermentativos ya que generan cambios morfológicos de los microorganismos e incluso su muerte⁹⁴.

⁸⁹ RAHMAN, Op. cit., p. 97

⁹⁰ CHIESA, Simone y GNANSOUNOU, Edgard. Use of Empty Fruit Bunches from the Oil Palm for bioethanol production: a thorough comparison between dilute acid and dilute alkali pretreatment. En: Bioresour. Technol. Vol. 159 (2014) p. 355-364

⁹¹ GUPTA, Ryuk, SHARMA, Khethy y KUHAD, Romeer. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora* a wood substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* – NCIM 3498. En: Bioresour Technol. Vol. 100 (2009) p. 1214-1220

⁹² CHIN, Siew; CHIA, Chin; FANG, Zhen; ZAKARIA, Sarani; LI, Xing y ZHANG, Fan. A Kinetic study on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fibers using a microwave reactor system. En: Energy Fuels. Vol. 28 (2014) p. 2589-2597

⁹³ NEUREITER, Markus; DANNER, Herbert; THOMASSER, Christiane; SAIDI, Bamusi y BRAUN, Rudolf. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. En: Appl. Biochem. Biotechnol. Vol. 98 (2002) p. 49-58

⁹⁴ RAHMAN, Op. cit., p. 555

Respecto al contenido de azúcares reductores totales, Piarpuzan *et al.*⁹⁵ reportan en sus resultados una concentración de 6,44 g/L, mientras que en un estudio realizado por Sulaiman *et al.*⁹⁶ sobre el potencial de los residuos lignocelulósicos de la palma de aceite como fuente alternativa, reporta un valor de 7,66 g/L. Se puede observar que los valores reportados corresponden casi al doble de los valores obtenidos en esta investigación, esto se puede justificar en que la cantidad de azúcares liberada depende de varios factores como: el tipo de materia prima utilizada, las condiciones ambientales en donde se desarrollen los cultivos, el tipo de tratamiento o pretratamiento, las condiciones de hidrólisis que se utilicen para su obtención, entre otros. Además es posible que durante el proceso hidrolítico hayan tenido lugar reacciones de formación de productos de degradación, lo cual pudo haber influido directamente sobre la concentración total de los azúcares.

Los azúcares obtenidos en los hidrolizados presentaron variaciones en su concentración, las cuales se pueden producir debido a la variación de humedad que pudieron presentar las muestras, ya que en relación con los estudios realizados por Pernalet *et al.*⁹⁷ quienes trabajaron con bagazo de caña de azúcar, encontraron que el aumento de humedad está relacionado directamente con la degradación de hemicelulosa en solubles, principalmente hemicelulodextrinas, es decir, fracciones de hemicelulosa solubilizada que se hidrolizan más rápidamente que la hemicelulosa original. De esta manera la humedad pudo haber facilitado la penetración del ácido en la biomasa produciendo una mayor concentración de azúcares.

4.3 CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Posterior al proceso de activación de la cepa bacteriana se confirmaron las características macro y microscópicas del organismo fermentador.

A nivel macroscópico se observó que la morfología de las colonias en el medio sólido de cultivo (agar nutritivo) fue puntiforme, con bordes enteros, de superficie lisa, consistencia cremosa y de color amarillento, característico de este tipo de microorganismo como se indica en la figura 8.

⁹⁵ PIARPUZÁN, Op cit., p. 1134

⁹⁶ SULAIMAN, Op cit., p. 2695

⁹⁷ PERNALETE, Zoycris; PIÑA, Francibell; SUÁREZ, Madeleine; FERRER, Alexis y AIELLO, Cateryna. Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco. En: Bioagro Vol. 20 (2008) p. 3-10



Figura 8: Crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* en agar nutritivo
Fuente: Esta investigación

Las características más relevantes de este género fueron descritas por Collins *et al.*⁹⁸, las cuales fueron confirmadas microscópicamente mediante tinción de Gram. Se confirmó que efectivamente los microorganismos de la cepa activada pertenecen al grupo de las bacterias Gram-positivas, ya que se tiñó su pared celular de color rosa, carecían de movilidad y presentaban forma bacilar recta o ligeramente curvada como se observa en la siguiente figura:



Figura 9: Características microscópicas de *Corynebacterium glutamicum*
Fuente: ZAHOOOR. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products. 2012

⁹⁸ COLLINS, Matthew y CUMMINS, C. Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann. En: Sneath Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2 (1986). p. 1266-1276

4.4 PROCESO FERMENTATIVO

4.4.1 Cinética de crecimiento bacteriano de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Para determinar el perfil de la cinética del crecimiento bacteriano y el tiempo de incubación necesario para alcanzar el número de bacterias suficientes que garanticen un proceso de producción eficiente de ácido L-glutámico, se llevaron a cabo diferentes mediciones turbidimétricas bajo condiciones adecuadas de crecimiento, con las cuales se obtuvo la siguiente gráfica:

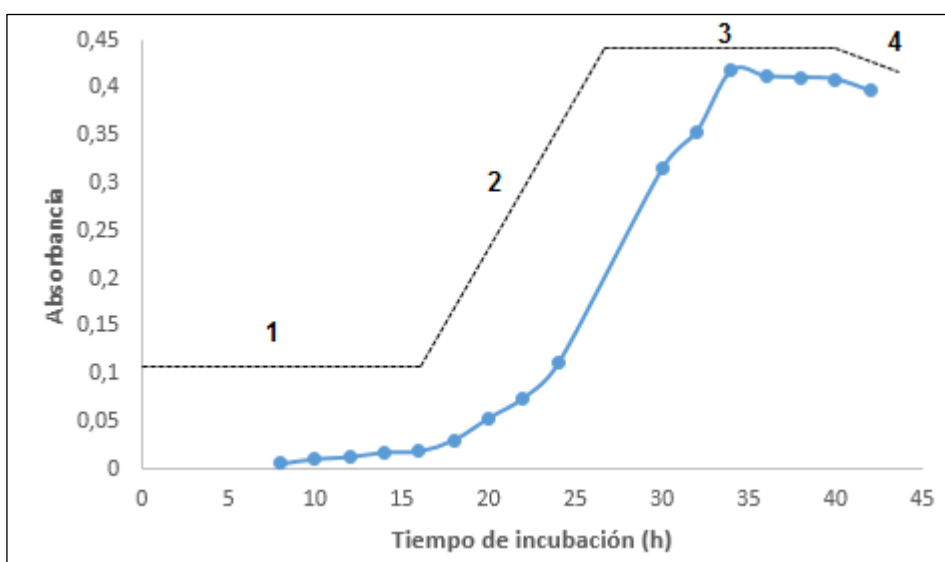


Figura 10: Perfil de la cinética de crecimiento bacteriano de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 en caldo nutritivo. 1) Fase de Latencia 2) Fase Exponencial 3) Fase Estacionaria 4) Fase de Muerte

Fuente: Esta investigación

Se puede observar claramente que la curva de cinética presentó 4 zonas características:

1. **Fase de latencia:** la cual inició desde el momento de inoculación hasta aproximadamente las 12 a 14 primeras horas, en donde únicamente se produjo el reacomodo de la composición macromolecular al nuevo ambiente de los microorganismos inoculados.
2. **Fase exponencial o logarítmica:** se produjo a partir de las 15 a las 34 horas en donde se alcanzó un máximo valor de absorbancia por no existir limitación

de nutrientes igual a 0.418 y equivalente a $1,72 \times 10^7$ cel/mL contadas en cámara de Neubauer. Estos resultados son similares a los reportados por Gómez y Lagos⁹⁹ que obtuvieron un máximo de absorbancia de 0,420 a las 36 horas equivalente a $2,3 \times 10^7$ cel/mL, para obtener ácido glutámico a partir de hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique usando el mismo microorganismo fermentador.

3. **Fase estacionaria:** se presentó desde las 35 a las 40 horas posteriores a la inoculación, en donde se detuvo el crecimiento debido al agotamiento de nutrientes.
4. **Fase de muerte:** presentada en tiempos posteriores a las 42 horas y producida posiblemente por la inducción de enzimas autolíticas que causan la muerte de los microorganismos¹⁰⁰.

El análisis del perfil cinético de la cepa bacteriana permitió visualizar uno de los parámetros determinantes en la producción de ácido L-glutámico, ya que se encontró que a las 34 horas la cinética indica que se alcanza un máximo de absorbancia y con ello la concentración más alta de células para conformar un cultivo previo (prefermentador) antes de pasar al biorreactor donde se lleva a cabo la producción del aminoácido.

Teniendo en cuenta lo anterior, los medios de fermentación fueron inoculados con cultivos prefermentados de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 a 34 horas.

4.4.2 Producción de ácido glutámico

En la tabla 12 se observan las concentraciones del aminoácido obtenido a partir de las concentraciones de azúcares en cada uno de los tratamientos con sus correspondientes tiempos de fermentación. Se observa que a medida que transcurre el tiempo de fermentación, la concentración de azúcares disminuye mientras la concentración del aminoácido aumenta. De igual manera en la muestra de glucosa utilizada como testigo se observa la misma tendencia.

La máxima producción de ácido L-glutámico se obtuvo a las 96 horas siendo mayor en el tratamiento T2 con una concentración de 0,8255 g/L usando hidrolizado y 0,8647 g/L en la fermentación testigo.

⁹⁹ GÓMEZ, Op. cit., p. 47

¹⁰⁰ QUIJANO, Op. cit., p. 49

Tabla 12: Tiempo de fermentación, consumo fuente de carbono y producción de ácido L-glutámico en los diferentes tratamientos

FUENTE DE CARBONO	TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES (g/L)				PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO (g/L)			
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
Hidrolizado raquis de palma	0	0,7323	0,7522	0,3840	0,3954	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	24	0,6923	0,6523	0,3726	0,3668	0,0804	0,1392	0,1000	0,2176
	48	0,5353	0,4953	0,3269	0,3126	0,3353	0,5118	0,1588	0,2765
	72	0,2527	0,2298	0,2584	0,2298	0,5706	0,7471	0,2961	0,2961
	96	0,2412	0,1898	0,1670	0,0699	0,5902	0,8255	0,3157	0,3549
Glucosa	0	0,7266	0,7408	0,3954	0,4011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	24	0,6609	0,6695	0,3611	0,3554	0,0412	0,0804	0,0412	0,1784
	48	0,4382	0,4011	0,2726	0,3012	0,3157	0,5118	0,1784	0,2569
	72	0,2013	0,1841	0,2327	0,2041	0,5314	0,7471	0,2765	0,2961
	96	0,1527	0,0928	0,1556	0,0899	0,5706	0,8647	0,2961	0,3745

Fuente: Esta investigación

Se puede observar que bajo las condiciones definidas para el tratamiento T2, se obtuvo la mayor concentración de ácido L-glutámico, mientras que bajo las condiciones del tratamiento T3 se obtuvo una menor concentración del mismo, posiblemente debido al exceso de fuente de nitrógeno en el medio que inhibe el crecimiento celular. Respecto a este nutriente nitrogenado cabe mencionar que existe aún gran discrepancia en la literatura, si bien algunos autores mencionan que es mejor usar una fuente de nitrógeno orgánico, otros por el contrario han encontrado buenos resultados usando fuentes de nitrógeno inorgánicas como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ¹⁰¹. No obstante, a pesar de que el amonio es compatible con la tasa de crecimiento celular llevándose a cabo un crecimiento más rápido, se ha encontrado que la síntesis de los genes necesarios para la utilización de compuestos nitrogenados es reprimida en las células cultivadas en presencia de altas cantidades del mismo. Además, en un estudio realizado por Fisher¹⁰², se reporta que en comparación con las células bacterianas cultivadas con otras fuentes de nitrógeno, las células cultivadas en medios con altas concentraciones de amonio contienen los niveles más bajos de glutamina sintetasa (GS), una enzima crítica en la asimilación de amonio; ésta cataliza la formación de glutamina de amonio y glutamato que es la única vía para la síntesis de glutamina en la célula. La glutamina sirve tanto como un aminoácido y como un donante de nitrógeno para la síntesis de aproximadamente el 15% de las moléculas nitrogenadas en la célula. Como resultado, la síntesis y la actividad de GS está estrechamente regulada en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno para asegurar que los suministros adecuados de

¹⁰¹ ALMUDENA, Martín. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la producción de xantano. Madrid, 1999. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Ingeniería Química

¹⁰² FISHER, Susan. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! En: Mol. Microbiol. Vol. 32 (1999) p. 223-232

glutamina están presentes en las células cuyo crecimiento se ve limitado por la disponibilidad o exceso de nitrógeno¹⁰³.

Aunque cinéticamente se ha descrito el crecimiento de *C. glutamicum* en un medio definido¹⁰⁴, en esta investigación la finalidad fue determinar las mejores condiciones de producción y por lo tanto con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza ANOVA (Anexo H), obteniendo un valor-P igual a 0,7329 para el factor tipo de fuente de carbono (hidrolizado o glucosa), que al ser mayor que 0,05 no influye significativamente en la producción de ácido glutámico; es decir, que se puede usar indistintamente cualquier fuente de carbono como sustrato. Por otra parte se obtuvieron valores-P menores a 0,05 para las variables concentración de fuente de carbono, concentración de fuente de nitrógeno y la interacción entre las dos variables, por lo cual se considera que estos tres factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la producción del aminoácido con un 95,0% de nivel de confianza.

Teniendo en cuenta lo anterior, para establecer las mejores condiciones, se realizó una prueba de múltiples rangos para los factores que presentaron una significancia estadística (Anexos I y J), obteniéndose los mejores resultados de producción bajo las condiciones establecidas para el tratamiento T2, que se corroboró con el gráfico de interacciones indicado en la figura 11, en donde se puede observar que la línea azul que representa el tratamiento en el que se emplean 7 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, presenta un valor máximo de producción cuando se utilizó una concentración de 1g/L de fuente de carbono es decir 30 mL del hidrolizado en este caso.

¹⁰³ REITZER, Larry. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. En: Am Soc Microbiol Vol. 1 (1996) p. 391-407

¹⁰⁴ CASTELLANOS, Angélica; GARCIA, Lina; ASTUDILLO, Myriam; LÓPEZ, Jorge y FLOREZ Luz. Parámetros fisicoquímicos para la síntesis de ácido láctico o etanol de la bacteria (*Corynebacterium glutamicum*) En: Acta biol. Colomb. Vol. 16 (2011) p. 15-32

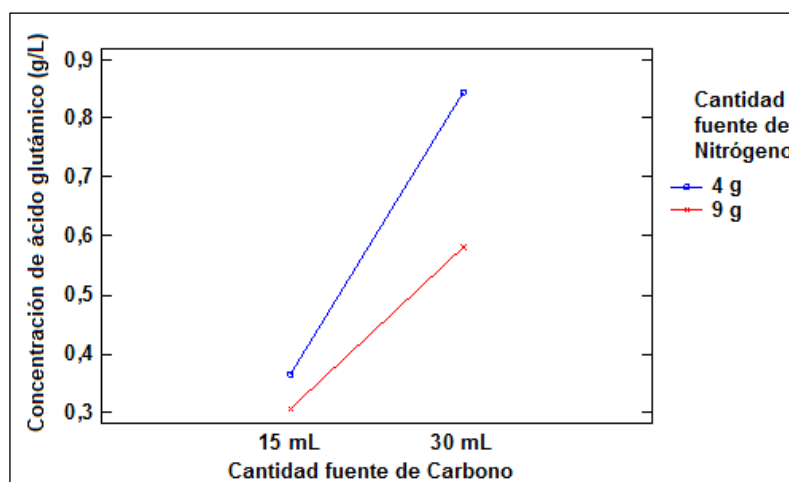


Figura 11: Gráfico de interacciones cantidad fuente de carbono y nitrógeno
Fuente: Esta investigación

Identificadas las mejores condiciones de producción, se determinaron los perfiles cinéticos de fermentación para cada tratamiento (Anexos K, L y M), los cuales presentaron una tendencia similar al tratamiento T2, en donde se obtuvo la mayor concentración de aminoácido y se pudo observar en la siguiente figura:

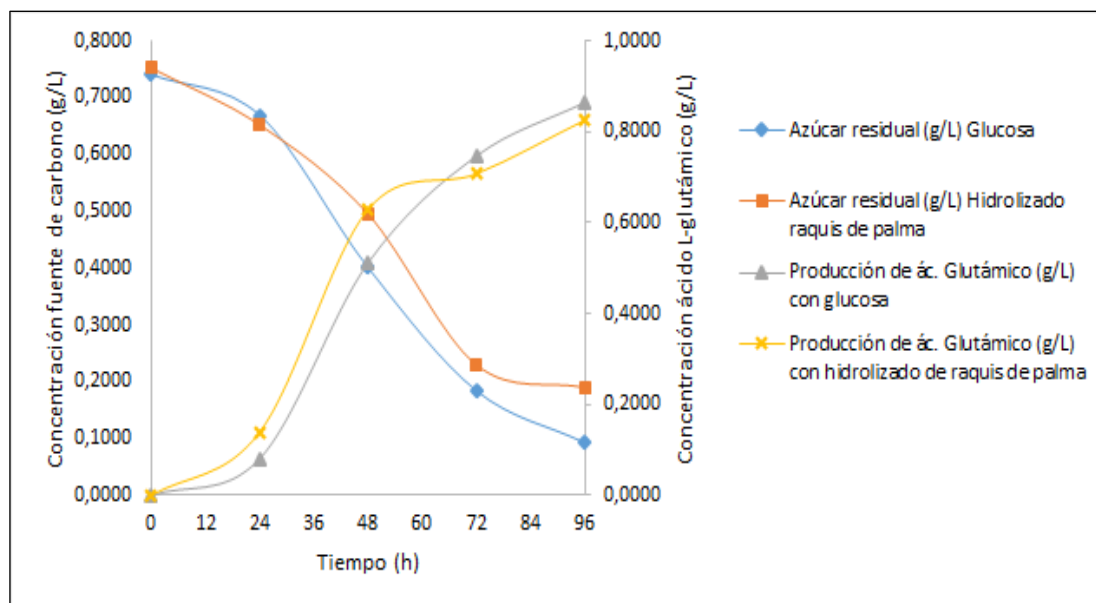


Figura 12: Cinética de fermentación para el tratamiento T2. Tiempo de fermentación, cantidad de azúcares reductores y concentración de ácido L-glutámico producido
Fuente: Esta investigación

En los tratamientos T1 y T3, el porcentaje de rendimiento resulto ser menor al 50%, debido a que la concentración de los iones amonio a pesar de influir directamente en la producción potencial del aminoácido, ya que por aminación reductiva el α -cetoglutarato formado en el ciclo del TCA se convierte en ácido glutámico¹⁰⁵, debe mantenerse a un nivel bajo en el medio, puesto que concentraciones altas son perjudiciales para el crecimiento celular y la formación del producto, como indica un estudio sobre la optimización de las condiciones de fermentación para la producción de ácido glutámico con una cepa de *Corynebacterium glutamicum* NIAB BNS-14 realizado por Niaz *et al.*¹⁰⁶ quienes utilizaron como fuente de nitrógeno sales de amonio a una concentración entre 4,5 g/L y 5,5 g/L, obteniendo una máxima producción de ácido glutámico equivalente a 8,5 g/L. En el tratamiento T4 a pesar de que la fuente de nitrógeno se encontraba en igual concentración que en el tratamiento T2, su bajo rendimiento se puede justificar en el hecho de que al reducirse la cantidad de fuente de carbono, se limitó el proceso de bioconversión.

4.5 RECUPERACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO L-GLUTÁMICO

El ácido glutámico se obtuvo como un sólido amarillento con pequeñas impurezas de color marrón, las que se eliminaron con repetidas recristalizaciones hasta obtener cristales brillantes de color blanco e inodoros similares al patrón comercial, como se observa en la siguiente figura:



Figura 13: Ácido L-glutámico A) Aislado directamente de los caldos fermentativos B) Producto purificado después de dos recristalizaciones C) Producto purificado después de cuatro recristalizaciones
Fuente: Esta investigación

¹⁰⁵ CRUEGER, Op. cit., p. 181

¹⁰⁶ NIAZ, Bushra; NADEEM, Shahid; MUZAMMIL, Muhammad; KHAN, Junaid y ZAHOOOR, Tahir. Optimization of fermentation conditions for enhanced glutamic acid production by a strain of *Corynebacterium glutamicum* NIAB BNS-14. En: Pakistan J. Zool. Vol. 41 (2009) p. 261-267

En las corridas cromatográficas de capa delgada (figura 14), se pueden observar varias manchas de tamaños y distancias recorridas similares, lo que permitió calcular el Rf de cada una de ellas, el cual oscila entre 0,25 y 0,27 similar al reportado por Walton *et al.*¹⁰⁷. Por su parte, para el ácido glutámico usado como patrón se obtuvo un Rf de 0,26, igual al obtenido por Ahmed *et al.*¹⁰⁸ quienes evaluaron la producción de ácido glutámico con *Corynebacterium glutamicum* utilizando sirope como fuente de carbono, usando en la cromatografía la misma mezcla de solventes para la fase móvil.

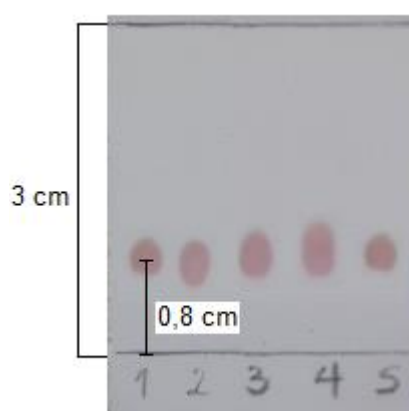


Figura 14: Corrida cromatográfica. 1: Ácido glutámico estándar. 2: Ácido glutámico T1. 3: Ácido glutámico T2. 4: Ácido glutámico T3. 5: Ácido glutámico T4

Fuente: Esta investigación

El promedio de rendimiento del proceso fermentativo para la obtención de ácido L-glutámico para los diferentes tratamientos indica que el mayor porcentaje de recuperación se obtuvo en el tratamiento T2, mientras que para las condiciones establecidas en el tratamiento T3 se obtuvo el menor porcentaje (tabla 13). Esto probablemente se debe a que mientras los azúcares reductores se encontraban en bajas concentraciones, el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se encontraba en exceso impidiendo el crecimiento del microorganismo, ya que cuando se presentan elevadas concentraciones de amonio se ve afectada la glutamato deshidrogenasa (GDH), enzima encargada de su fijación al oxidar un mol de NADPH por cada mol de amonio asimilado, impidiendo el normal desarrollo de la bacteria e incluso su muerte¹⁰⁹.

¹⁰⁷ WALTON, Harold y REYES, Jorge. Análisis químico e instrumental moderno. España. Reverté, S. A., 1983. p. 334

¹⁰⁸ AHMED, Youssri; KHAN, Jalal; ABULNAJA, Kau y AL-MALKI, Abdulrahman. Production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* using dates syrup as carbon source. En: Afr. J. Microbiol. Res. Vol. 7 (2013) p. 2071-2077

¹⁰⁹ BURKOVSKI, Andreas. Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. En: FEMS Microbiol. Rev. Vol. 27 (2003) p. 617-628

Tabla 13: Porcentaje de recuperación de ácido glutámico a partir de los diferentes tratamientos

TRATAMIENTO	RECUPERACION DE ÁCIDO GLUTÁMICO (%)	
	GLUCOSA	HIDROLIZADO RAQUIS DE PALMA DE AFRICANA
1	35,89 ± 5,07	29,50 ± 6,40
2	66,92 ± 2,96	56,67 ± 3,52
3	24,62 ± 4,86	28,55 ± 4,82
4	52,21 ± 2,74	46,24 ± 0,84

Fuente: Esta investigación

El porcentaje de recuperación obtenido en esta investigación bajo las mejores condiciones, resultó ser similar al reportado por Amin *et al.*¹¹⁰ quienes obtuvieron un 58,50% del aminoácido al llevar a cabo un proceso de cultivo continuo con células inmovilizadas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 dentro de cubos de poliuretano. De igual forma, se obtuvo un rendimiento similar al reportado por Gómez y Lagos¹¹¹ quienes obtuvieron un 56,01%, a partir de hidrolizados de pulpa de café utilizando el mismo microorganismo.

4.6 IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.6.1 Análisis por GC-FID

Los sólidos obtenidos en cada uno de los tratamientos se identificaron por GC-FID. Para esto, se trataron las muestras con el agente derivatizante MTBSTFA (N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida), el cual confiere a sus derivados gran estabilidad térmica e hidrolítica, que se lo otorga el gran impedimento estérico del grupo terc-butilo, que al reaccionar con el grupo carboxilo de los aminoácidos, concede una alta masa molecular, lo que mejora la separación cromatográfica¹¹². En contraste con otros derivatizantes como el trimetilyodosilano que es un reactivo de siliación fuerte pero no tan estable y produce más subproductos de reacción o el trimetilsililimidazol, reactivo preferido para las reacciones con grupos hidroxilo pero pobre para la derivatización de aminas y amidas; el MTBSTFA posee una mejor reactividad para grupos carboxilo, hidroxilo, tiol y aminas primarias y

¹¹⁰ AMIN, Op. cit., p. 62

¹¹¹ GÓMEZ, Op. cit., p. 48

¹¹² ULISSE, Karla. Microextracción de fármacos antiinflamatorios no esteroideos desde matrices acuosas usando polímero de impresión molecular inmovilizado en un sistema de disco rotatorio. Santiago – Chile, 2014. Trabajo de grado (Química). Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Departamento de Química Analítica e Inorgánica.

secundarias, por lo que es considerado el reactivo de elección para la preparación de terc-derivados butildimetilsililo¹¹³.

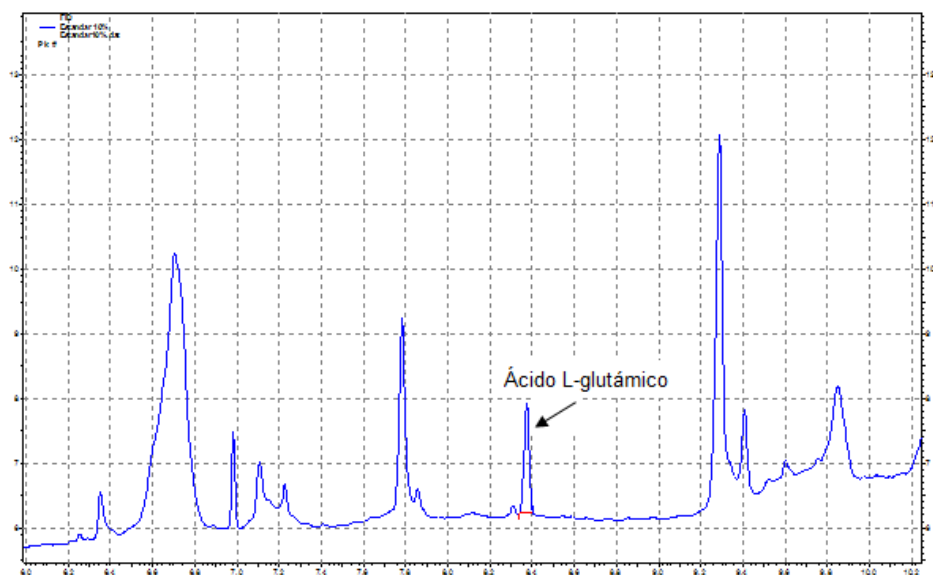


Figura 15: Cromatograma de ácido L-glutámico estándar
Fuente: Esta investigación

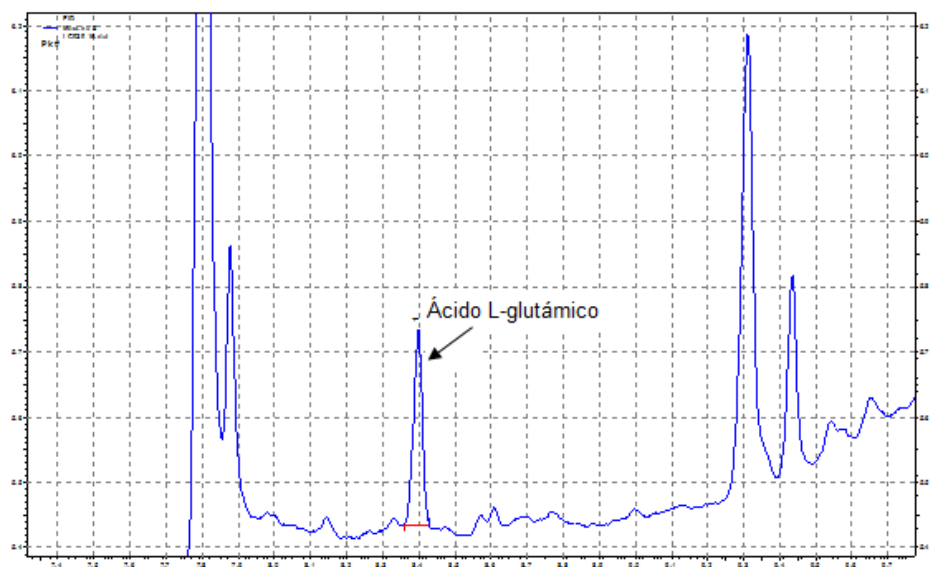


Figura 16: Cromatograma de ácido L-glutámico obtenido en el tratamiento T2
Fuente: Esta investigación

¹¹³ POOLE, Op. cit., p. 9

Como era de esperarse, el pico observado en el cromatograma obtenido a partir del tratamiento T2 (figura 16), presenta mayor intensidad respecto a los picos de los cromatogramas de los demás tratamientos (Anexos N, O y P); además, se puede observar que el perfil cromatográfico es similar al del estándar (figura 15).

Se observó en los cromatogramas que el tiempo de retención de los picos identificados como el aminoácido oscilan entre 8,2 y 8,3 minutos, cercanos al tiempo de retención del aminoácido utilizado como estándar, a partir de lo cual se puede decir que el sólido obtenido efectivamente corresponde a ácido L-glutámico (tabla 14).

Tabla 14: Tiempo de retención del ácido glutámico obtenido en cada tratamiento

TRATAMIENTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (t _R)
Estándar	8,338
1	8,259
2	8,398
3	8,244
4	8,236

Fuente: Esta investigación

Cabe mencionar que la presencia de diferentes grupos funcionales en una misma molécula al igual que sus diferentes ambientes estéricos en una sola reacción, pueden dar lugar a múltiples picos, porque se pueden presentar reacciones incompletas, formación de derivados inestables y a la formación de subproductos debido a las condiciones necesarias para completar la reacción¹¹⁴.

4.6.2 Análisis por HPLC-PDA

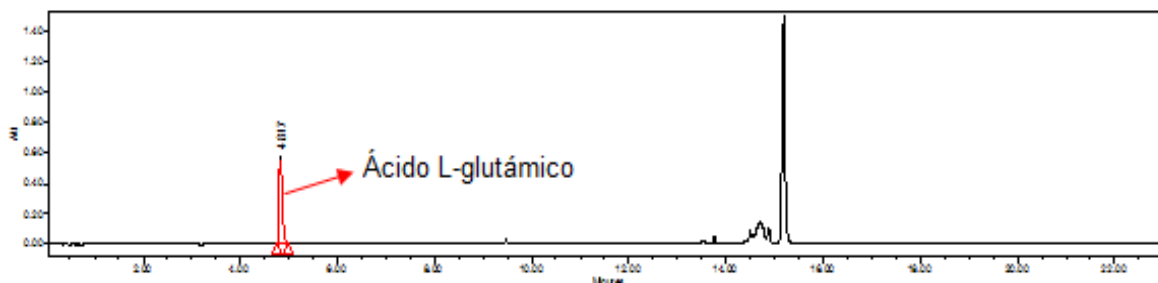


Figura 17: Cromatograma obtenido mediante HPLC-PDA del ácido L-glutámico producto del tratamiento T2

Fuente: Esta investigación

¹¹⁴ Ibid., p. 6

En el cromatograma resultado del análisis mediante HPLC-PDA (figura 17) se puede observar que el pico característico del ácido L-glutámico aparece a un tiempo de retención de 4,817 min, muy cercano al tiempo de retención del aminoácido utilizado como patrón que aparece a 4,783 min (Anexo Q). Además se puede observar un pico de gran intensidad a un tiempo de aproximadamente 15 min que de acuerdo a lo reportado en la literatura se podría mencionar que corresponde a un derivado cíclico característico del aminoácido que se produce en el medio ácido en el cual se lleva a cabo el proceso de derivatización¹¹⁵.

El tiempo de retención encontrado experimentalmente, resultó ser similar al reportado por Heinrikson *et al.*¹¹⁶ quienes identificaron el aminoácido a un tiempo de 5,07 min a 254 nm, al llevar a cabo un análisis de aminoácidos por cromatografía líquida en fase reversa usando para el proceso de derivatización fenilisotiocianato (PITC) para obtener los respectivos feniltiocarbamil derivados. Además, en la figura 18 se puede observar una comparación de la muestra analizada con el patrón de ácido glutámico los cuales presentan tiempos de retención muy cercanos.

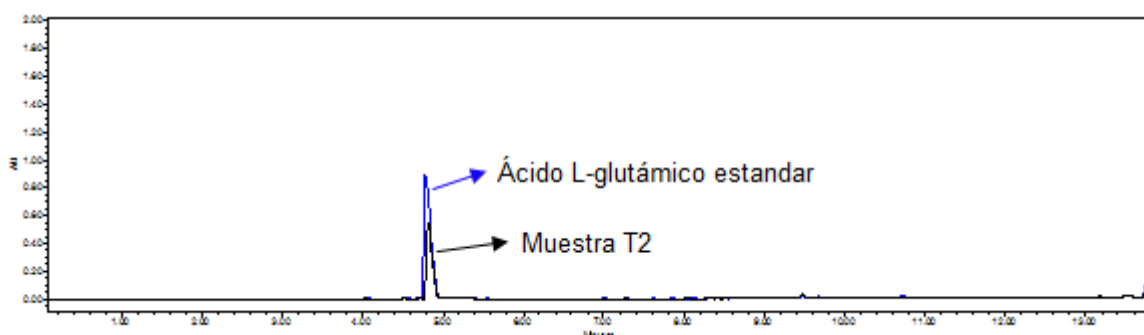


Figura 18: Comparación ácido L-glutámico patrón con el obtenido en el tratamiento T2
Fuente: Esta investigación

¹¹⁵ EDMAN, Op. cit., p. 277

¹¹⁶ HEINRIKSON, Robert y MERIDITH, Stephen. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. En: Anal. Biochem. Vol. 136 (1984) p. 65-74.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una concentración de azúcares reductores de 3,322 g/L en los hidrolizados de raquis de palma a partir de una relación 1/30 peso de muestra seca/volumen de H_2SO_4 al 2%, un tiempo de 6 horas de digestión y una temperatura constante de 85°C, estableciéndose como las mejores condiciones.

Utilizando una concentración de 1 g/L de fuente de carbono y 7 g/L de fuente de nitrógeno se alcanzó una recuperación de ácido L-glutámico de alta pureza del 56,67% \pm 3,52 usando hidrolizado de raquis de palma y 66,92% \pm 2,96 en el tratamiento testigo con glucosa como patrón.

Se identificó el aminoácido y su pureza mediante análisis por cromatografía de gases (GC-FID) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-PDA), en donde se obtuvieron tiempos de retención similares al aminoácido usado como estándar (8,398 minutos y 4,817 minutos, respectivamente).

RECOMENDACIONES

Se recomienda llevar a cabo un pretratamiento alcalino de los residuos lignocelulósicos antes de comenzar el proceso de hidrólisis con el objetivo de remover la mayor cantidad de la lignina presente en el material vegetal y obtener mayor cantidad de azúcares reductores.

Identificar los azúcares obtenidos en el proceso de hidrólisis mediante métodos cromatográficos con el fin llevar a cabo un estudio más detallado de la composición química del raquis de palma africana e identificar los azúcares que son más provechosos para el microorganismo.

Probar otras técnicas fermentativas como en Fed-Batch, continua o con reactores de enzimas o células inmovilizadas con las cuales se podría obtener mayores cantidades del aminoácido.

Ampliar el campo de estudio sobre el uso del material lignocelulósico utilizando otros residuos como fuente de carbono orgánico para obtener ácido L-glutámico, otros aminoácidos y/o diferentes productos de valor agregado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, Youssri; KHAN, Jalal; ABULNAJA, Kau y AL-MALKI, Abdulrahman. Production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* using dates syrup as carbon source. En: Afr. J. Microbiol. Res. Vol. 7 (2013) p. 2071-2077

ALMUDENA, Martín. Desarrollo de Modelos Cinéticos para Bioprocesos: Aplicación a la Producción de Xantano. Madrid, 1999. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Ingeniería Química

ALVAREZ, Antonio; GARCÍA, Enrique; DOMÍNGUEZ, María; GRANADOS, Joaquín *et al.* Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. En: Rev. Iberoam. Polim. Vol. 13 (2012) p. 140-150

AMIN, Gaudí y AL-TALHI, Almezher. Production of L-glutamic acid by immobilized cell Reactor of the bacterium *Corynebacterium glutamicum* entrapped into Carrageenan gel beads. En: World Appl Sci J Vol. 1 (2007) p. 62-67

AN, Kejing; ZHAO, Dandan; WANG, Zhengfu; WU, Jijun; XU, Yujuan y XIAO, Gengsheng. Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. En: Food Chem. Vol. 197 (2016) p. 1292–1300

BASIRON, Yusof y DARUS, Ariffin. La industria de la palma de aceite de contaminación a cero desechos. En: Revista Palmas. Vol. 18 (1997) p. 51-56

BAYONA, Olga y SÁNCHEZ Melba. Activación física del raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) para la obtención de carbón activado. Bucaramanga, 2006. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química

BEECH, Freemy y DAVENPORT Ray. Methods in Microbiology: Isolation, purification and maintenance of yeasts. London. Academic Press, 1971 p. 153-182

BIOPHARMA. Disposable Bioreactors: The Next Generation [en línea] <<http://www.biopharminternational.com/disposable-bioreactors-next-generation>> [citado en 28 de junio de 2016]

BURKOVSKI, Andreas. Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. En: FEMS Microbiol. Rev. Vol. 27 (2003) p. 617-628

CAMPS, Pelayo; VÁQUEZ, Santiago y ESCOLANO, Carmen. Fundamentos de Síntesis de Fármacos. Barcelona, Publicacions i Edicions Universitat de Barcelona, 2005 p. 20

CASTELLANOS, Angélica; GARCIA, Lina; ASTUDILLO, Myriam; LÓPEZ, Jorge y FLOREZ Luz. Parámetros Fisicoquímicos para la Síntesis de Ácido Láctico o Etanol de la Bacteria (*Corynebacterium glutamicum*) En: Acta biol. Colomb. Vol. 16 (2011) p. 15-32

CELEROMICS. Conteo celular con Hematocitómetro. < <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/Como-contar-celulas-con-camara-de-Neubauer.php>> [en línea] [citado en 14 de febrero de 2016]

CHIESA, Simone y GNANSOUNOU, Edgard. Use of Empty Fruit Bunches from the Oil Palm for bioethanol production: a thorough comparison between dilute acid and dilute alkali pretreatment. En: Bioresour. Technol. Vol. 159 (2014) p. 355–364

CHIN, Siew; CHIA, Chin; FANG, Zhen; ZAKARIA, Sarani; LI, Xing y ZHANG, Fan. A Kinetic Study on Acid Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fibers Using a Microwave Reactor System. En: Energy Fuels. Vol. 28 (2014) p. 2589–2597

COLLINS, Matthew y CUMMINS, C. Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann. En: Sneath Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2 (1986) p. 1266-1276

CORPODIB. Análisis Socioambiental de la Implementación del Programa de Biodiesel en Colombia [en línea] <<http://www.si3ea.gov.co/si3ea/documentos/documentacion/Biodiesel/Capitulo%2003.pdf>> [citado en 15 de marzo de 2014]

CRUEGER, Wulf y CRUEGER, Anneliese. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Zaragoza, España. Acribia S. A., 1993. p. 179

EDMAN, Pehr. Preparation of phenylthiohydantoins from natural amino acids. En: Acta. Chem. Scand. Vol. 4 (1950) p. 277-282

FEDEPALMA. Tumaco requiere medidas extraordinarias para alcanzar soluciones a su problemática. [en línea] <<http://web.fedepalma.org/node/984>> [citado en 14 de febrero de 2017]

FEDUCHI, Elena; BLASCO, Isabel; ROMERO, Carlos y YAÑEZ, Esther. Bioquímica. Conceptos esenciales. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana, 2011. p. 243

FISHER, Susan. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! En: Mol. Microbiol. Vol. 32 (1999) p. 223-232

FOLLMANN, Martin; OCHROMBEL, Ines; KRÄMER, Reinhard; TRÖTSCH, Christian; *et al.* Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. En: BMC Genomics. Vol. 10. (2009) p. 1-23

FORERO, Carlos; CEDIEL, Alexandra; RIVERA, José; SUAZA, Andrea y SIERRA, Fabio. Preliminary study on the energetic potential of palm cuesto and coconut shell in Colombia. En: RISE. Vol. 8 (2012) p. 19-25

GARCÍA, Mariano; QUINTERO, Rodolfo y LÓPEZ, Agustín. Biotecnología alimentaria. Producción industrial de aminoácidos. México. LIMUSA, (2004) p. 403-419

GARZÓN, Sandra y HERNÁNDEZ Catalina. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Pereira, 2009. Trabajo de grado (Químico Industrial). Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Escuela de Tecnología Química. Química Industrial

GÓMEZ, Yanet y LAGOS, Verónica. Obtención y purificación de ácido glutámico a partir de hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique fermentables por la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. San Juan de Pasto, (2013). Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química

GONZÁLEZ, Yolanda; GONZÁLEZ, Orfil y NUNGARAY, Jesús. Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. En: Redalyc. Vol 3 (2005) p. 1-18

GOPINATH, Valasha y NAMPOOTHIRI Kerish. Encyclopedia of Food Microbiology. En: Scient Direct [base de datos en línea]. 2ª Edición; p. 504-517 [citado en 10 de marzo de 2014]. Disponible en SCIENT DIRECT Research Databases

GUPTA, Ryuk, SHARMA, Khethy y KUHAD, Romeer. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora* a wood substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* – NCIM 3498. En: Bioresour Technol. Vol. 100 (2009) p. 1214–1220

HAYNES, Jill y BRITZ, Margaret. The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency obtained by electroporation. En: J Gen Microbiol. Vol. 136 (1990) p. 255-263

HEINRIKSON, Robert y MERIDITH, Stephen. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. En: Anal. Biochem. Vol. 136 (1984) p. 65-74.

HERNÁNDEZ, Alicia; ALFARO, Ileana, y ARRIETA, Ronald. Microbiología Industrial. San José, Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia, (2003) p. 206

HERNÁNDEZ, Armando; GONZALES, Yenisey; FRÓMETA, Claudia y CALZADA, Rafael. Parámetros cinéticos y simulación del proceso fermentativo de la cepa atenuada 638 de *Vibrio cholerae*. En: Revista CENIC. Vol. 3 (2012) p. 245-252

HERRERA, Fredy; LEÓN, Guillermo y LLANO, Natalia. Efectos del tratamiento térmico sobre el perfil de aminoácidos libres en jamón de cerdo envasado en película retortable. Caldas – Antioquia, (2013). Tesis (Especialización en Alimentación y Nutrición). Corporación Universitaria Lasallista. Facultad de Ingenierías

INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Diccionario de cáncer. [en línea] <<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=44342>> [citado en 10 de noviembre de 2016]

JORRÍN, Jesús; ABRIL, María y BÁRCENA, José. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina [en línea] <<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/11%20CROMATOGRAF%C3%8DA%20DE%20CAPA%20FINA%20DE%20AAs.pdf>> [citado en 22 de febrero de 2014]

KHIARI, Ramsey; MHENNI, Marcio; BELGACEM, Merdhas y MAURET Eleanor. Chemical composition and pulping of date palm rachis and *Posidonia oceanica* – A comparison with other wood and non-wood fibre sources. En: Bioresource Technol. Vol. 101 (2010) p. 775–780

KURIHARA, Kenzo. Glutamate: from discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami). En: Am. J. Clin. Nutr. Vol. 90 (2009) p. 19-22

LETEK, Michal. Identificación y análisis funcional de genes implicados en el catabolismo del ácido glucónico en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. León, (2002). Trabajo de grado (Licenciatura en Biología). Universidad de León. Facultad de Biología. Departamento de Ecología, Genética y Microbiología.

MENÉNDEZ, José. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA. Bases fisiopatológicas. Madrid. Ediciones Norma, 1999. p. 139

MILLER, Gail. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. En: Anal. Chem. Vol. 31 (1959) p. 426-428

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CIENCIA. La Transformación Industrial de la Producción Agropecuaria. [en línea] <<https://sede.educacion.gob.es/publiventa/PdfServlet?pdf=VP11730.pdf&area=E>> [citado en 20 de marzo de 2014]

MUÑOZ, Javier y PÉREZ, William. Obtención de ácido glutámico a partir de hidrolizados de papa por procesos de fermentación, utilizando la bacteria *Corynebacterium glutamicum*. San Juan de Pasto, (2004). Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias exactas y Naturales. Departamento de Química

NEUREITER, Markus; DANNER, Herbert; THOMASSER, Christiane; SAIDI, Bamusi y BRAUN, Rudolf. Dilute-Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions. En: Appl. Biochem. Biotechnol. Vol. 98 (2002) p. 49-58

NAIAZ, Bushra; NADEEM, Shahid; MUZAMMIL, Muhammad; KHAN, Junaid y ZAHOR, Tahir. Optimization of fermentation conditions for enhanced glutamic acid production by a strain of *Corynebacterium glutamicum* NIAB BNS-14. En: Pakistan J. Zool. Vol. 41 (2009) p. 261-267

OWEN, Ward. Biotecnología de la Fermentación: Principios, Procesos y Productos. Zaragoza, España. Acribia S. A., (1991). p. 183-198

PERNALETE, Zoycris; PIÑA, Francibell; SUÁREZ, Madeleine; FERRER, Alexis y AIELLO, Cateryna. Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco. En: Bioagro Vol. 20 (2008) p. 3-10

PIARPUZÁN, Diego; QUINTERO, Julián y CARDONA, Carlos. Empty fruit bunches from oil palm as a potential raw material for fuel ethanol production. En: Biomass Bioenerg. Vol. 35 (2011) p. 1130–1137

POOLE, Colin. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. En: J. Chromatogr. A. Vol. 7 (2013) p. 2-14

QUIJANO, Amelia y ZULETA, Wendy. Propuesta de cinética de fermentación para la producción de ácido glutámico. San Salvador, (2006). Trabajo de grado (Licenciatura en química y farmacia). Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia

QUINTANA, Germán; ARROYAVE, Mónica y SUAREZ, David. Obtención de pulpa a partir de los residuos de palma africana pretratados con steam explosion. En:

CONGRESO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACION EN CELULOSA Y PAPEL
(V : 2008 : Guadalajara, México)

RAHMAN, Sha; CHOUDHURY, Jean; AHMED; Ali y KAMARUDDIN, Ahsler. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. En: Bioresour. Technol. Vol. 98 (2007) p. 554–559

RAHMAN, Sha; CHOUDHURY, Jean. y AHMED, Ali. Production of xylose from oil palm empty fruit bunch fiber using sulfuric acid. En: Biochem. Eng. J. Vol. 30 (2006) p. 97–103

REITZER, Larry. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. En: Am Soc Microbiol Vol. 1 (1996) p. 391-407

RENOVETEC. ¿Qué es la biomasa? [en línea] <<http://www.plantasdebiomasa.net/que-es-la-biomasa.html>> [citado en 09 de noviembre de 2016]

REYES, Sandra y ORTIZ, Julio. Aprovechamiento de los residuos de la palma africana [en línea] < <http://www.materiales-sam.org.ar/sitio/biblioteca/CONAMET-SAM2008/pdfs/a9.pdf>> [citado en 17 de febrero de 2014]

RIOS, Sandra y VESGA, Stella. Obtención y evaluación de pulpa a partir del raquis de la palma africana mediante procesos de soda y soda-antraquinona. Bucaramanga, (2008). Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química

ROCA, Pilar; OLIVER, Jordi y RODRIGUEZ, Ana M. Bioquímica. Técnicas y Métodos. España. Editorial Hélyce, (2003). p. 144–146

ROJAS, Alberto. Conceptos y práctica de microbiología general. Palmira. Universidad Nacional de Colombia, 2011. p.50

SAIZ, Alejandro; BONETE, Enrique; CARRILLO, Marc; FERRAJOLI, Luigi *et al.* Responsa lurisperitorum Digesta. Salamanca. Editores Universidad de Salamanca, (2000) p. 264

SÁNCHEZ, Antonio. Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Barcelona, (1998). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Biotecnología.

SANTOS, Gloria. Diagnóstico y propuesta de gestión de los residuos sólidos generados por el proceso de extracción de aceite crudo de palma africana en

palmas oleaginosas bucarelia S.A. Bucaramanga, (2007). Tesis (Especialización en Química Ambiental). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química

SATYAJIT, Dutta; SUPRATIM, Ray y NAGARAJAN, Kuppuswamy. Glutamic acid as anticancer agent: An overview. En: Saudi Pharm J. Vol. 21 (2013) p. 337–343

SULAIMAN, Othman; SALIM, Nurjannah; AFEEFAH, Noor; HASHIM, Rokiah; IBRAHIM, Mazlan y SATO, Masatoshi. The Potential of Oil Palm Trunk Biomass as an Alternative Source for Compressed Wood. En: Bioresource Vol. 7 (2012) p. 2688-2706

TECHNOSERVE. Manual Técnico de Palma Africana. [en línea] <<http://palma.webcindario.com/manualpalma.pdf>> [citado en 27 de junio de 2016]

THE NATIONAL AGRICULTURAL LIBRARY'S. Glossary [en línea] <<http://agclass.nal.usda.gov/mtwdk.exe?w=14077&k=default&s=5&t=2&n=1&l=115>> [citado en 28 de junio de 2016]

ULISSE, Karla. Microextracción de fármacos antiinflamatorios no esteroideos desde matrices acuosas usando polímero de impresión molecular inmovilizado en un sistema de disco rotatorio. Santiago – Chile, 2014. Trabajo de grado (Química). Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Departamento de Química Analítica e Inorgánica.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Caracterización del departamento de Nariño -ODDR- [en línea] <http://www.observatorioddrr.unal.edu.co/productos_academicos/nuevos/narino/Caracterizacion_del_departamento_de_Narino.pdf> [citado en 14 de febrero de 2014]

VELASCO, Rodrigo; MONTENEGRO, Diego; VÉLEZ, John; GARCÍA, Carlos y DURANGO, Diego. Biotransformation of compounds aromatic substituted by filamentous phytopatogenic fungus of the genera Botryodiplodia and Colletotrichum. En: Rev. Soc. Quím. Vol. 75 (2009) p. 94-111

VIJAYALAKSHMI, Payala y SARVAMANGALA, Dhurjeti. Production of L-Glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300T and *Arthrobacter globiformis* MTCC 4299 using fruits of *Muntingia calabura* Linn. En: Int. Res. J. Microbiol. Vol. 4 (2011) p. 116-121

VOET, Judith y VOET, Donald. Bioquímica. Madrid, España. Reverté, 2006. p. 452

WALTON, Harold y REYES, Jorge. Análisis Químico e Instrumental Moderno. España. Reverté, S. A., 1983. p. 334

WOO, Kang-Lyung. Determination of Amino Acids in Foods by Reversed-Phase HPLC with New Precolumn Derivatives, Butylthiocarbamyl, and Benzylthiocarbamyl Derivatives Compared to the Phenylthiocarbamyl Derivative and Ion Exchange Chromatography. En: Mol. Biotechnol. Vol. 24 (2003) p. 69–88

ZHANG, Dongxu; LING ONG, Yee; LI, Zhi y CHUAN WU, Jin. Optimization of dilute acid-catalyzed hydrolysis of oil palm empty fruit bunch for high yield production of xylose. En: Chem. Eng. J. Vol. 181–182 (2012) p. 636–642

ANEXOS

Anexo A: Método de Miller y recta de calibrado para cuantificación de azúcares

Preparación reactivo DNS

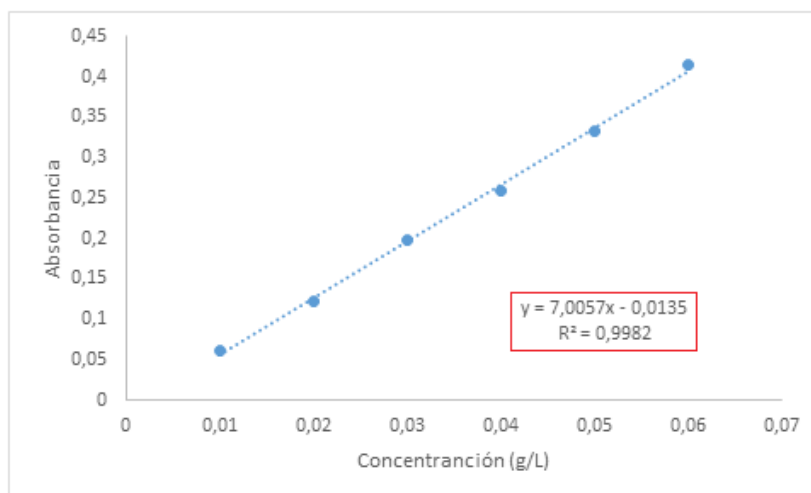
Se disolvieron 1,6 g de NaOH en agua destilada, se adicionaron 30 g de tartrato de sodio y potasio y 1 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico). Se aforó la mezcla a 100 mL con agua destilada y se almacenó en un frasco ámbar a 4°C.

Curva de calibración

Se preparó una solución patrón de glucosa 4 g/L, a partir de la cual se prepararon soluciones diluidas y se agregó DNS a cada una como se indica en la tabla.

	Blanco	1	2	3	4	5	6
Vol glucosa (µL)	---	25	50	75	100	125	150
Vol H ₂ O (µL)	500	475	450	425	400	375	360
Vol DNS (µL)	500						

Los tubos se llevaron a calentamiento en baño de agua hasta ebullición por 5 min, se enfriaron en baño de hielo y se reconstruyeron con 9 mL de agua destilada, se agitaron, dejaron en reposo por 15 min y finalmente se determinó su absorbancia a 540 nm. Con los datos obtenidos se graficó la curva de calibración de absorbancia en función de la concentración.



Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores
Fuente: Esta investigación

Anexo B: Especificaciones caldo nutritivo Oxoid CM 0001

Caldo nutritivo

Código: CM0001

Un medio fluido de uso general para el cultivo de microorganismos no exigentes en sus requisitos nutricionales. Sangre, suero, azúcares, etc., se puede añadir según sea necesario para fines especiales.

Fórmula	g/L
Polvo "Lab-Lemco"	1.0
Extracto de levadura	2.0
Peptona	5.0
Cloruro de sodio	5.0
pH 7,4 ± 0,2 a 25 ° C	

Preparación

Añadir 13 g por cada litro de agua destilada. Mezclar bien y distribuir en los recipientes finales. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

Descripción

El extracto de carne Lab-Lemco se combina con peptona y cloruro de sodio para formar el caldo básico. Se añade el extracto de levadura para proporcionar vitaminas y minerales para ayudar a acelerar el crecimiento de la mayoría de los organismos.

El caldo nutritivo puede ser enriquecido con otros ingredientes tales como los carbohidratos, sangre etc., para fines especiales.

Condiciones de almacenamiento y la vida útil

Utilizar antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Almacenar el medio preparado por debajo de 25°C.

Aspecto

Medio deshidratado: color amarillo paja, libre de impurezas.
Medio preparado: una solución de color amarillo paja.

Anexo C: Especificaciones agar nutritivo Oxoid CM 0003

Agar nutritivo

Código: CM0003 (Polvo)

Código: CM0004 (comprimidos)

Un medio de propósito general que puede ser enriquecido con sangre hasta un 10% u otro fluido biológico.

Fórmula	g/L
Polvo "Lab-Lemco"	1.0
Extracto de levadura	2.0
Peptona	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH 7,4 ± 0,2 a 25 ° C	

Preparación

Polvo: Suspender 28 g en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición para disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

Tabletas: Añadir una tableta a 5 mL de agua destilada y dejar en remojo durante 5 minutos. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

Descripción

El agar nutritivo es un medio de cultivo básico utilizado para cultivar organismos para fines de mantenimiento o para comprobar la pureza de cultivos de placas de aislamiento antes de pruebas.

Contiene una concentración de 1,5% de agar para permitir la adición de la sangre hasta un 10% u otro fluido biológico, según se requiera. El medio, sin adiciones, se puede usar para el cultivo de organismos que no son exigentes en sus requisitos nutricionales.

Condiciones de almacenamiento y la vida útil

Utilizar antes de la fecha de caducidad en la etiqueta. Almacene el soporte preparado entre 2-8°C.

Aspecto

Medio deshidratado: color amarillo paja, polvo libre de impurezas.
Medio preparado: Gel de color paja.

Anexo D: Cuantificación de ácido L-glutámico por el método de ninhidrina

Preparación reactivo de ninhidrina

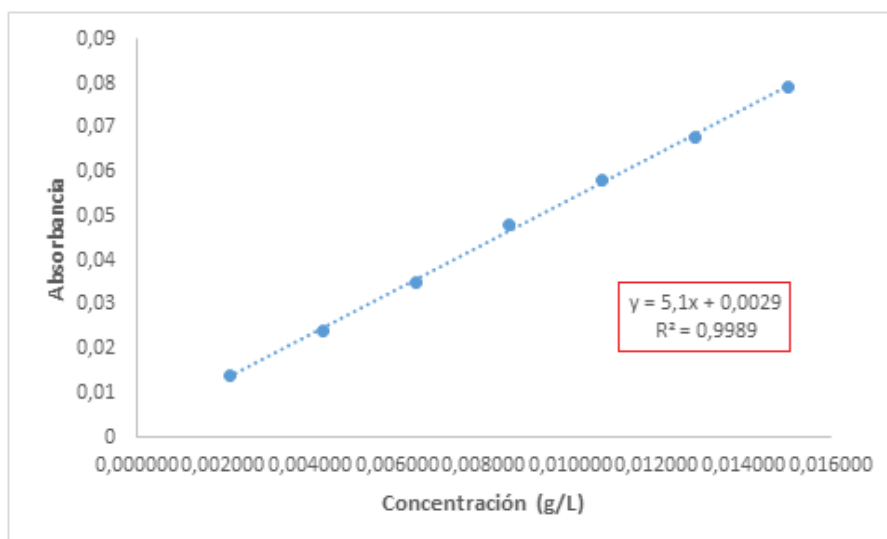
Se disolvieron 0,1 g de ninhidrina en 10 mL de etanol absoluto y se aforó a 100 mL con agua destilada. El reactivo se guardó en frasco ámbar bajo refrigeración.

Curva de calibración

Se preparó una solución patrón de ácido L-glutámico 0,15 g/L, a partir de la cual se prepararon soluciones diluidas y se agregó ninhidrina a cada una como se indica en la tabla.

	Blanco	1	2	3	4	5	6	7
Vol ácido L-glutámico (µL)	---	100	200	300	400	500	600	700
Vol H ₂ O (µL)	1000	900	800	700	600	500	400	300
Vol ninhidrina (µL)				1000				

Los tubos se llevaron a calentamiento en baño de agua hasta ebullición por 10 min, se enfriaron en baño de agua y se llevaron a un volumen final de 7 mL con agua destilada, finalmente se determinó su absorbancia a 570 nm. Con los datos obtenidos se graficó la curva de calibración de absorbancia en función de la concentración.



Curva de calibración para la cuantificación de ácido L-glutámico

Fuente: Esta investigación

Anexo E: Resultados de hidrólisis ácida de raquis de palma africana: réplicas, absorbancia y concentración de azúcares

[H ₂ SO ₄]]	TIEMPO (h)	RÉPLICAS	ABSORBANCIA *	CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES* (g/L)	PROMEDIO CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES (g/L)
2%	4	1	0,087	2,582	3,119
		2	0,108	3,113	
		3	0,129	3,661	
	6	1	0,127	3,601	3,322
		2	0,115	3,310	
		3	0,105	3,053	
	8	1	0,124	3,533	3,599
		2	0,127	3,610	
		3	0,129	3,653	
4%	4	1	0,094	2,754	3,045
		2	0,105	3,045	
		3	0,116	3,336	
	6	1	0,132	3,738	3,776
		2	0,134	3,781	
		3	0,135	3,807	
	8	1	0,129	3,653	3,873
		2	0,138	3,892	
		3	0,145	4,072	
6%	4	1	0,111	3,199	2,882
		2	0,105	3,045	
		3	0,107	2,402	
	6	1	0,111	3,199	3,576
		2	0,126	3,584	
		3	0,140	3,944	
	8	1	0,115	3,293	3,270
		2	0,114	3,267	
		3	0,113	3,250	

* Los datos de absorbancia y concentración se relacionan mediante la ecuación presentada en la curva de calibración del Anexo A

Anexo F: Análisis de varianza para el proceso de hidrólisis de raquis de palma africana

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GI	CUADRADO MEDIO	RAZÓN F	VALOR P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	1,84275	2	0,921375	10,14	0,0011
B:CONCENTRACIÓN ÁCIDO	0,485108	2	0,242554	2,67	0,0966
INTERACCIONES					
AB	0,459298	4	0,114824	1,26	0,3207
RESIDUOS	1,63629	18	0,0909049		
TOTAL (CORREGIDO)	4,42344	26			

Anexo G: Prueba de múltiples rangos para la concentración de azúcares por tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

TIEMPO	CASOS	MEDIA LS	SIGMA LS	GRUPOS HOMOGÉNEOS
4	9	3,01516	0,100501	X
6	9	3,55758	0,100501	X
8	9	3,58042	0,100501	X

CONTRASTE	SIG.	DIFERENCIA	+/- LÍMITES
4 - 6	*	-0,542416	0,298606
4 - 8	*	-0,565256	0,298606
6 - 8		-0,02284	0,298606

* indica una diferencia significativa.

Anexo H: Análisis de Varianza para la producción de ácido glutámico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de fuente de carbono	0,000145042	1	0,000145042	0,12	0,7329
B:Fuente de Carbono	0,854887	1	0,854887	709,41	0,0000
C:Fuente de Nitrógeno	0,156978	1	0,156978	130,27	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,000143082	1	0,000143082	0,12	0,7346
AC	0,00361131	1	0,00361131	3,00	0,1015
BC	0,0635922	1	0,0635922	52,77	0,0000
RESIDUOS	0,020486	17	0,00120506		
TOTAL (CORREGIDO)	1,09984	23			

Anexo I: Prueba de múltiples rangos para la producción de ácido glutámico por cantidad de fuente de carbono

Método: 95,0 porcentaje LSD

Cantidad Fuente de Carbono	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
15 mL	12	0,335283	0,0100211	X
30 mL	12	0,71275	0,0100211	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
15 mL - 30 mL	*	-0,377467	0,0299002

* indica una diferencia significativa.

Anexo J: Prueba de múltiples rangos para la producción de ácido glutámico por cantidad de fuente de nitrógeno

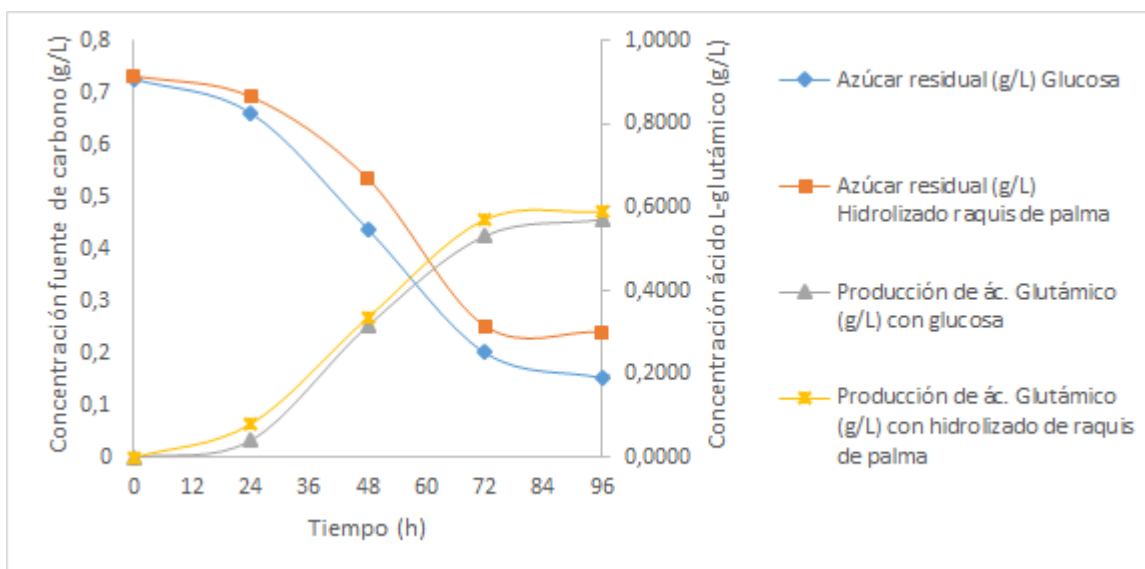
Método: 95,0 porcentaje LSD

Cantidad Fuente de Nitrógeno	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
9 g	12	0,443142	0,0100211	X
4 g	12	0,604892	0,0100211	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
4 g - 9 g	*	0,16175	0,0299002

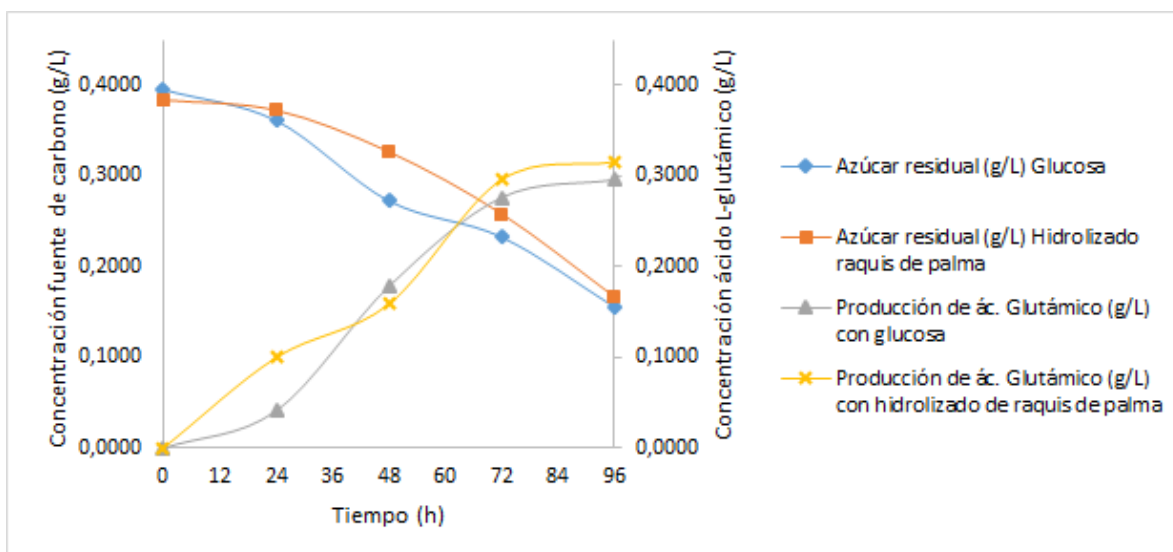
* indica una diferencia significativa.

Anexo K: Cinética de fermentación para el tratamiento T1. Tiempo de fermentación, cantidad de azúcares reductores y concentración de ácido L-glutámico producido



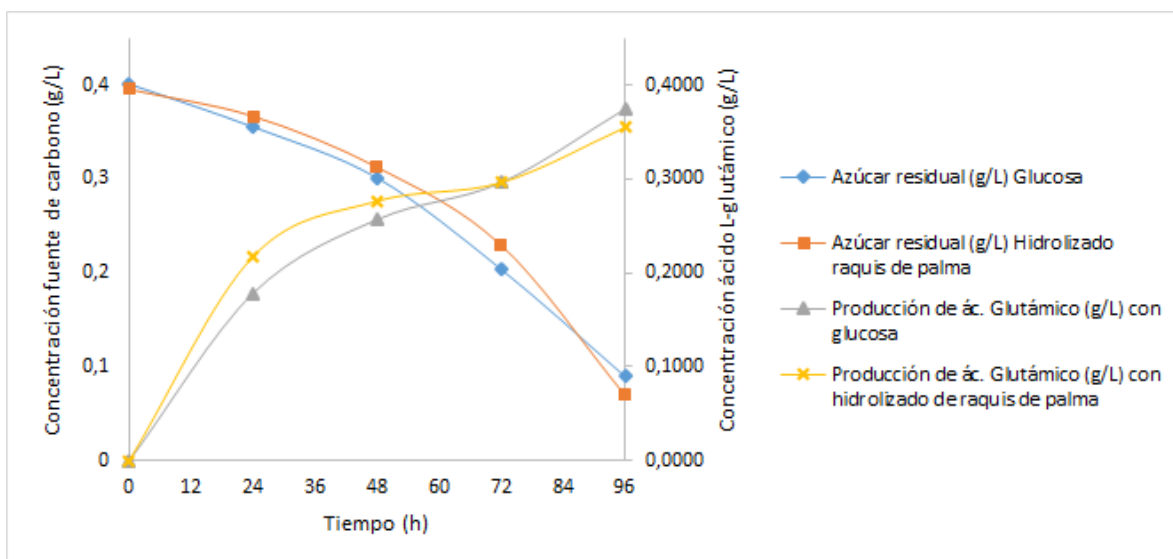
Fuente: Esta investigación

Anexo L: Cinética de fermentación para el tratamiento T3. Tiempo de fermentación, cantidad de azúcares reductores y concentración de ácido L-glutámico producido



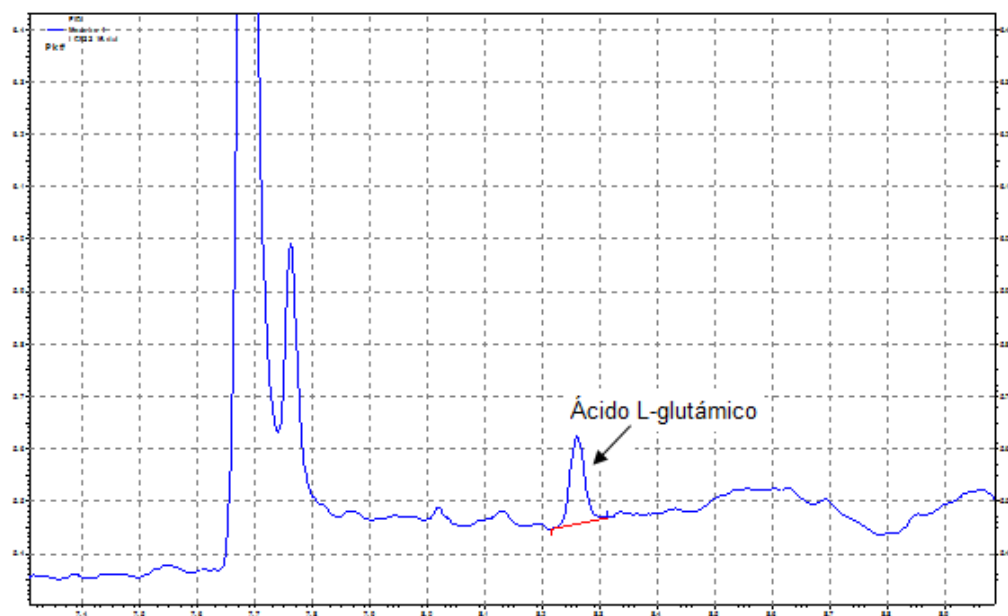
Fuente: Esta investigación

Anexo M: Cinética de fermentación para el tratamiento T4. Tiempo de fermentación, cantidad de azúcares reductores y concentración de ácido L-glutámico producido



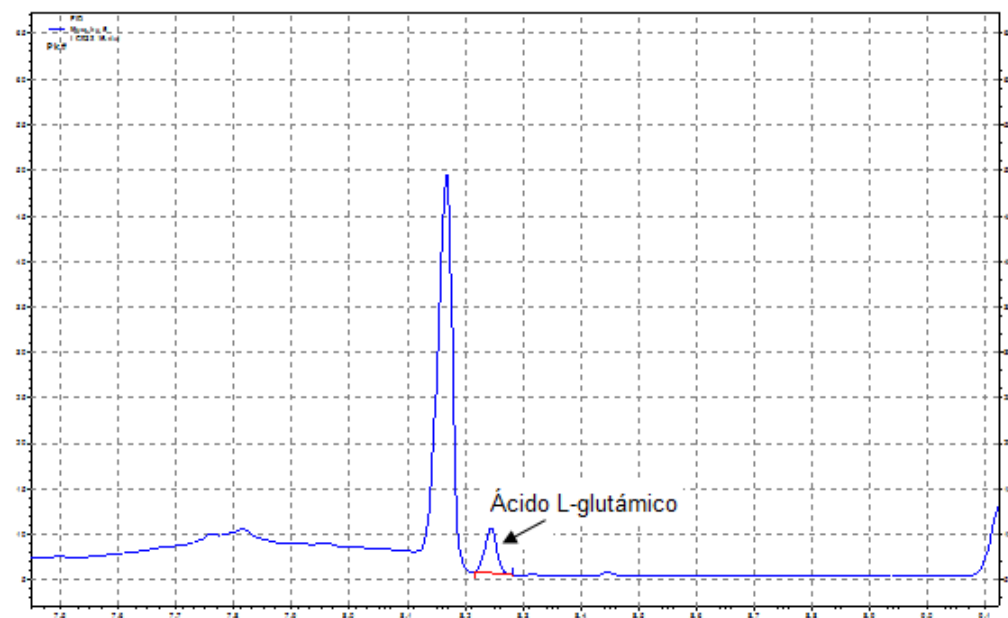
Fuente: Esta investigación

Anexo N: Cromatograma de ácido L-glutámico obtenido mediante el tratamiento T1



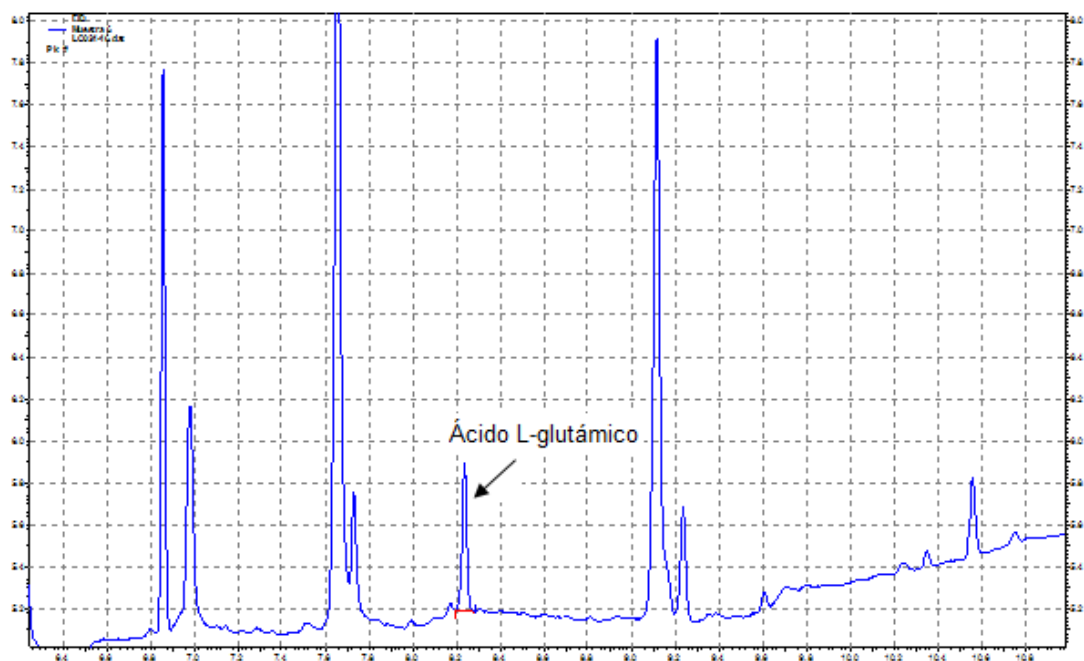
Fuente: Esta investigación

Anexo O: Cromatograma de ácido L-glutámico obtenido mediante el tratamiento T3



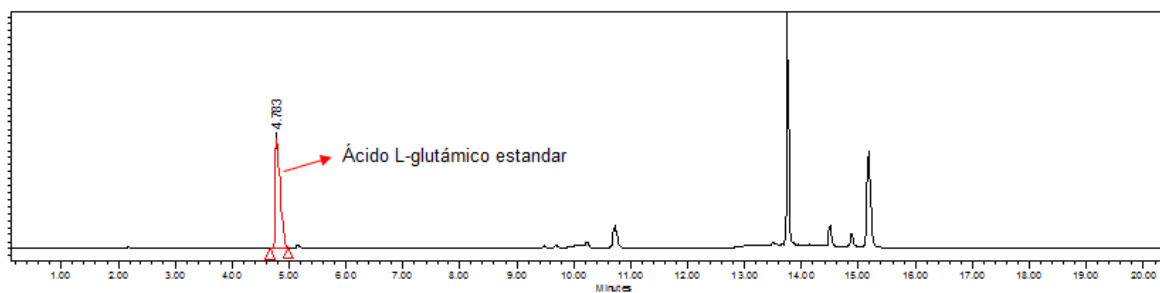
Fuente: Esta investigación

Anexo P: Cromatograma de ácido L-glutámico obtenido mediante el tratamiento T4



Fuente: Esta investigación

Anexo Q: Cromatograma HPLC-PDA de ácido L-glutámico estándar



Fuente: Esta investigación